

关于学位论文原创性和使用授权的声明

本人所呈交的学位论文，是在导师指导下，独立进行科学研究所取得的成果。对在论文研究期间给予指导、帮助和做出重要贡献的个人或集体，均在文中明确说明。本声明的法律责任由本人承担。

本人完全了解山东农业大学有关保留和使用学位论文的规定，同意学校保留和按要求向国家有关部门或机构送交论文纸质本和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权山东农业大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

保密论文在解密后应遵守此规定。

论文作者签名：高志

导师签名：张斌

日期：2007.6.17

摘 要

木聚糖是半纤维素的主要成分,其含量仅次于纤维素,是自然界可再生的丰富生物资源。木聚糖酶能降解木聚糖成木糖或木寡糖,在饲料、食品、纺织、造纸等行业有着广泛的用途,是现代酶学研究的热点之一。本文对黑曲霉 C-2 (*Aspergillus niger* C-2) 进行了发酵培养基的优化、产酶条件、酶学性质及应用等的研究。主要研究结果如下:

1 黑曲霉 C-2 固体发酵生产木聚糖酶的最佳培养基组成为:麸皮:玉米芯粉 (1:1), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%, 尿素 3%, KH_2PO_4 0.1%, TW-80 0.3%, 料水比 1:1.4, 初始 pH 7.0; 最佳培养条件为: 500mL 三角瓶装料 20g, 接种 2mL 孢子悬液 (10^9 cfu/mL), 30℃ 培养 42h。条件优化后, 黑曲霉 C-2 固体发酵产酶活力由 1717U/g 提高到 10068U/g。

2 黑曲霉 C-2 木聚糖酶的最适反应 pH 值为 4.4~4.8, 在 pH4.5~7.5 范围内稳定, 在 pH4.5~5.5 范围内保温 6h 仍能保持 95% 以上的酶活力; 最适反应温度为 50℃; Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Na^+ 三种金属阳离子对酶反应有促进作用, Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Ag^+ 、 K^+ 和 Fe^{2+} 对酶反应有不同程度的抑制作用。 Zn^{2+} 、EDTA 对酶活影响不显著。黑曲霉 C-2 发酵产物抽提液进行薄板层析发现, 抽提液中含有 5 种木寡糖组分。

3 托盘固态发酵时, 种曲接种量 0.5%~0.75%, 装料量 300g~400g, 料厚 3~4cm, 料水比 1:1.8, 发酵 40h 后 60℃ 烘干。补水能够提高托盘发酵产物木聚糖酶活力, 干燥发酵产物中的木聚糖酶在 80℃~90℃ 下保存 1h 酶活损失小于 15%。

4 分别进行匾盘、种曲机中试放大研究。匾盘培养方式菌丝生长缓慢且易污染, 发酵酶活为 4234U/g; 种曲机由于降温效果差则出现了烧曲现象, 发酵酶活 300~3622U/g。采用在种曲机内培养菌丝、转入匾盘产酶的两步发酵工艺, 有效避免了上述缺陷, 最终发酵产物酶活达 7461U/g。

5 将本试验制得的木聚糖酶制剂与市场复合酶产品在小猪上进行喂养试验, 结果发现木聚糖酶制剂能够提高增重 11.8%、降低料肉比 8.8%, 降低腹泻, 给养殖户带来更高的经济效益。

关键词: 木聚糖酶, 固体发酵, 黑曲霉, 酶学性质

Abstract

As a crucial components of hemicellulose, xylan is the most abundant living resources that can be recycled in nature except of cellulose. Xylanase is the enzyme family that dehydrates xylan into xylose or oligoxylose, which has extensive application in industries such as animal feed, food, fabric and papermaking. So researches of xylanase by microorganism has become one of the hot spots of modern fermentation industry and enzyme preparation industry. In this paper, a xylanase production fungi *Aspergillus niger* C-2 was studied, which included optimization of solid-state fermentation condition such as cultivating environmental factors and culture compositions. The application and characterizations of xylanase were studied, too. The main results were as follows:

1. The culture medium and cultivation conditions for xylanase production of *Aspergillus niger* C-2 under solid state fermentation were optimized. The results confirmed that the optimum culture medium was composed by wheat bran and corncob at the ratio of 1:1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%, urea 3%, KH_2PO_4 0.1%, TW-80 0.3%, initial pH 7.0, and ratio of optimal carbon source and water 1:1.4. The optimum cultivation conditions included culture load 20g in 500mL flask, inoculant volume 2mL with spores of 10^9 cfu/mL, after the inoculated culture was fermented for 42h at 30°C, the fermented culture yielded xylanase with highest activity of 10068U/g.

2. Some characterizations of xylanase were studied. The optimum pH value of xylanase was pH4.4~4.8, which was stable over pH4.5~6.5. The remained enzyme activity was over 95% after treatment 6h under pH4.5~5.5. The optimal temperature of xylanase was 50°C. The activity of xylanase was increased by Cu^{2+} , Mg^{2+} and Na^+ , decreased by Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Ag^+ , K^+ and Fe^{2+} , and not effected significantly by Zn^{2+} and EDTA. Five oligoxyloses were founded in the extracts of the fermented culture.

3. The optimal solid-state fermentation condition of *Asp. niger* C-2 on trays was: solid inoculant 0.5%~0.75%. culture load 300g to 400g with culture thick

3cm~4cm, and the ratio of material and water was 1:1.8. Xylanase activity was increased significantly by water supplement during the fermenting process. The fermented culture was dried at 60°C when the fermentation had been carried for 40h. The lost of xylanase activity was less than 15% even if the xylanase preparation was treated for 1h at 80°C~90°C.

4. The pilot-scale production of xylanase with solid-state fermentation was performed on charging trays and in machine of solid-state fermentation. When fermenting in charging trays, the mycelia grew slowly and was contaminated easily, the activity of xylanase in the fermented culture was 4234U/g. When fermenting in machine of solid-state fermentation, the inner temperature of culture was so high that the mycelia couldn't grow, which resulted only 300~3622U/g xylanase activity in the fermented culture. when the mycelia culturing was in charging trays and the enzyme fermenting was in machine, respectively, the limitations above were avoided, and the final xylanase activity of *Asp. niger* C-2 culture was reached 7461U/g.

5. Feeding experiments in young pigs were performed using enzyme preparation product and xylanase preparation. Results showed that xylanase preparation increased weight 11.8% and decreased 8.8% of ratio of feed to meat.

Key words: Xylanase, Solid state fermentation, *Aspergillus niger*, Characterization

1 引言

植物细胞壁主要是由纤维素,半纤维素和木质素等物质组成。其中半纤维素的主要成分是木聚糖,是仅次于纤维素含量,占世界第二丰富的可再生生物资源,约占植物细胞干重的15%~35% (Blely, 1985)。木聚糖主要存在于植物细胞的次生壁中,处于木质素及其它多聚糖之间,起着连接作用;但在有些植物的初生壁中也有发现 (Wong, 1988)。一般依来源不同可将木聚糖分为软木木聚糖和硬木木聚糖 (Prade, 1995),木聚糖酶则是降解木聚糖的最主要酶。

1.1 木聚糖与木聚糖酶

1.1.1 木聚糖

木聚糖 (Xylan) 是植物细胞壁的重要成份,是除纤维素之外自然界中最为丰富的多糖,也是自然界中可再生获得的丰富资源之一。木聚糖的主链为 β -D-吡喃木糖以 β -1,4-糖苷键连接的线状分子,在主链骨架上每隔一定的木糖单位发生侧链糖基的取代,取代的频率和结构依其来源和分离方式的不同而有所差异。自然界中的木聚糖多为异聚多糖,同聚多糖分布很少, Kulkarni (1999) 和 Eda (1976) 发现,仅见于烟草和某些种子外壳中。由于木聚糖分子结构为 β -1,4-木糖苷键连接的木糖聚合物,并在其木糖基的 O-2 或 O-3 位以共价或非共价键连有 α -L-阿拉伯糖、甘露糖或 4-O-甲基糖醛酸、果胶和木质素等分枝,所以很难被分解。自然界存在的大量而难以被利用的木聚糖,其结构如图 1 所示。木聚糖存在于植物细胞的细胞壁中,和木质纤维的其它成分之间存在着不同程度的相互作用。木聚糖以共价键与木质素相连接,即木聚糖的阿拉伯糖残基和葡萄糖醛酸残基通过酚残基如阿魏酸和香豆酸与木质素相连 (Jeffries, 1994; Jung, 1991)。木聚糖同其它碳水化合物的结合除通过化学键连接之外,还可能通过其它相互作用如氢键等相互连接 (Kato, 1981)。

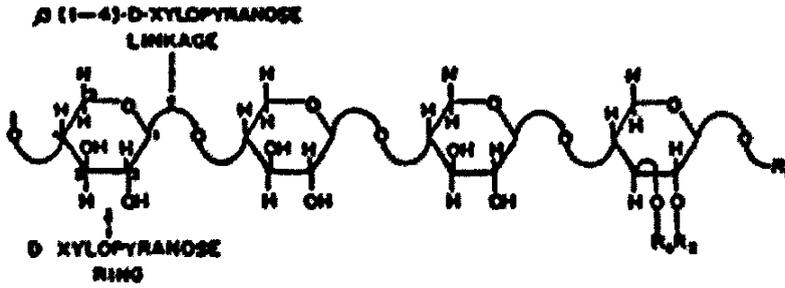


图 1 木聚糖的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of xylan

R1: p Coumaric acid; α -D-glucuroic acid; α -D-Arabinofuranose

R2: Acetyl group; α -D-Glucuranopyranose [Ca Lingain];

4-O-Methyl- α -D-Glucurannopyranose [Ca Lignin]; α -L-Arabinofuranose [Ca and C8 Lignin, Ferulic acid, Acetyl group, p Coumaric acid]; Ca Lignin;

R3: Acetyl group; α -L-Arabinofuranose [Ca and C8 Lignin, Ferulic acid, Acetyl group, p Coumaric acid]; β -D-Galactopyranosyl (1-5) α -L-Arabinofuranose;

1.1.2 木聚糖酶

木聚糖酶通常是指内切和外切木聚糖酶的统称, 狭义上的木聚糖酶仅限于 β -1,4-内切木聚糖酶 (1,4- β -D-木聚糖水解酶 EC3.2.1.8), 负责木聚糖主链骨架的降解。其作用方式是在不同位点上作用于木聚糖和长链木寡糖, 从 β -1,4-木聚糖主链的内部切割木糖苷键, 从而使木聚糖降解为木寡糖 (张树政, 1998)。其水解产物主要为木二糖与低聚木糖, 也有少量的木糖、阿拉伯糖和甘露糖。广义上的木聚糖酶是指能够降解木聚糖或半纤维素的一组酶的总称。由于木聚糖结构的复杂性, 它的完全降解需要多种水解酶的参与而共同完成, 表 1 (杨瑞金, 1998) 列出了木聚糖降解酶系的组成。

表 1 木聚糖降解酶系

Table 1 Xylanolytic enzyme systems

木聚糖降解酶	Xylanolytic enzyme
β -1,4-内切木聚糖酶	EC3.2.1.8; 1,4- β -D-endoxylanase
β -木糖苷酶	EC3.2.1.37; β -xylosidase
α -L-呋喃型阿拉伯糖苷酶	EC3.2.1.55; α -L-arabinofuranosidase
α -葡萄糖醛酸酶	EC3.2.1.1; α -glucuronidase
乙酰木聚糖酯酶	EC3.2.1.6; Acetylxylyan esterase
酚酸酯酶	Phenol acid esterase

β -1,4-内切木聚糖酶 (EC3.2.1.8) 以内切方式作用于木聚糖主链, 产生不同链长的寡糖及少量的木糖, 是木聚糖降解酶系中最关键的酶 (Sunna, 1997), 同时也是目前人们研究最多了解最深入的木聚糖降解酶。 β -木糖苷酶 (EC3.2.1.37) 作用于木寡糖的末端, 释放出木糖残基。尽管有许多木聚糖酶都能水解木聚糖或者木寡糖释放出木糖, 但唯有 β -木糖苷酶能够水解木二糖。 α -L-呋喃型阿拉伯糖苷酶和 α -葡萄糖醛酸酶是能够释放侧链糖的木聚糖降解酶; α -葡萄糖醛酸酶和酚酸酯酶是在降解乙酰化木聚糖时起作用的木聚糖降解酶 (邹永龙, 1999; 怀文辉, 2000)。图 1 (杨瑞金, 1998) 是木聚糖降解酶的作用位点示意图。

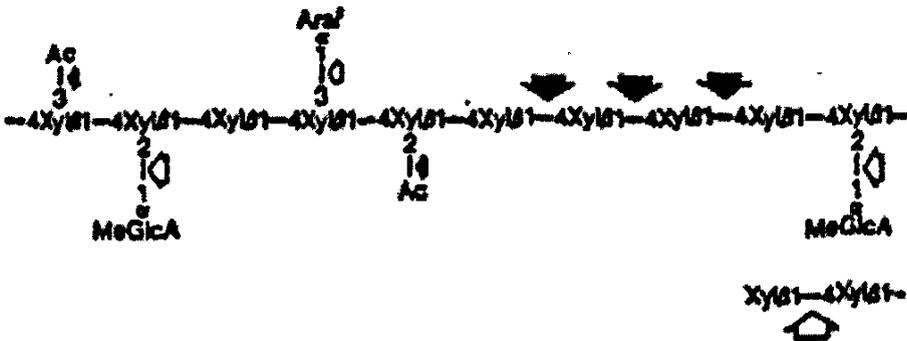


图 2 木聚糖水解酶系及其作用位点

Fig. 2 Xylanolytic enzyme and hydrolytic sites

注: Xyl: 木糖基; MeGlcA: 甲基葡萄糖醛酸基; Araf: 阿拉伯糖基; Ac: 乙酰基

- ☛ β -1,4-内切木聚糖酶 (β -1,4-endoxylanase) (EC3.2.1.8)
- ☛ β -木糖苷酶 (β -xylosidase) (EC3.2.1.37)
- ☛ α -葡萄糖醛酸酶 (α -glucuronidase) (EC3.2.1.1)
- ☛ α -L-阿拉伯糖呋喃糖苷酶 (α -L-arabinofuranosidase) (EC3.2.1.55)
- ☛ 乙酰酯酶 (acetyterase) (EC3.2.1.6) 或乙酰木聚糖酯酶

1.1.2.1 β -1,4-内切木聚糖酶 (β -1,4-endoxylanase)

在内切木聚糖酶的作用前期,所形成的主要产物是聚合度较大的低聚木糖,随着水解的持续进行,可生成木三糖、木二糖,但一般不会生成木糖。根据水解产物可分为有脱支活性和无脱支活性两大类,前者水解产物是阿拉伯低聚木糖,无游离的阿拉伯低聚木糖,而后者则可以生成阿拉伯糖。所研究的细菌和真菌木聚糖酶都是含有一个亚基的简单蛋白,在大多数微生物中木聚糖酶往往是多基因编码的。不同来源木聚糖酶的分子量和等电点有较宽的范围,分子量为 8.5~145kDa,等电点 pI 为 3.0~10.3,发现最小的为多黏芽孢杆菌 *Bacillus polymyxa* 产生的 6kDa 木聚糖酶分子(高培基,2005)。1988年,Wong等根据酶的理化特性分为两大类,即分子量小于 30kDa 的酶,多为碱性蛋白,另一类分子量大于 30kDa 的酶,多为酸性蛋白。

绝大多数 β -1,4-内切木聚糖酶的最适 pH 小于 7.0,最适反应温度在 45℃~75℃之间。木聚糖主链上的取代基团对媒介过程存在阻碍作用,是否有空间障碍导致还不能确定,但有些取代基团有助于酶的催化基团去向并定位于特定的酶切位点,如黑曲霉 *Aspergillus niger* 的两个木聚糖酶 pI8.0 和 pI9.6 所催化的反应产物中并没有阿拉伯糖,而且对去除了阿拉伯糖残基的寡聚木糖作用很小或者不起作用,由此看出其作用位点要求近旁有阿拉伯糖残基存在。

1.1.2.2 β -木糖苷酶 (β -xylosidase)

该酶分子量为 26~360kDa, pI3.3~7.3。在细菌和酵母中该酶主要存在于细胞内。 β -木糖苷酶主要作用于寡聚木糖,属于外切酶,从非还原末端释放出木糖,随着聚合度的增加活力下降,二聚木糖是其最佳底物。许多黑曲霉的 β -木糖苷酶既能作用于木糖苷键又能酶切 α -阿拉伯糖苷键、 β -

葡萄糖苷键和 β -半乳糖苷键，而在高浓度底物情况下，甚至可以表现出 1,4-木糖苷转移酶和 1,3-木糖苷转移酶活性，是低聚木糖转化为多聚木糖。 β -木糖苷酶和 β -1,4-内切木聚糖酶共同作用可以使木聚糖降解为木寡糖或者木糖（高培基，2005）。

1.1.2.3 α -L-呋喃阿拉伯糖苷酶 (α -L-arabinofuranosidase)

由于缺少合适的天然底物等原因，该酶的研究报道很少，现在已知阿拉伯糖苷酶多以单体存在，分子量 53~495kDa，pI 2.5~9.3，最适 pH 在 2.5~6.9 之间。该酶分为两种，占多数的是外切酶，作用于对硝基酚-呋喃型阿拉伯糖苷和分支阿拉伯聚糖，另一种少数的是内切酶，仅作用于线性阿拉伯聚糖。

1.1.2.4 α -葡萄糖醛酸酶 (α -L-glucuronidase)

α -葡萄糖醛酸酶水解葡萄糖醛酸和木糖残基之间的 α -1,2-糖苷键，该酶分子量一般在 100kDa 以上，pI 小于 4.0，最适 pH 在 3.3~6.0 之间。其底物特异性随酶的来源不同而不同，来源于黑曲霉的 α -葡萄糖醛酸酶可以作用于 4-O-甲基葡萄糖醛酸木聚糖，经内切木聚糖酶作用后产生的木寡糖更适合于该酶。

1.1.2.5 乙酰木聚糖酯酶 (acetylxyln esterases)

乙酰木聚糖酯酶作用于木糖残基 C₂ 和 C₃ 位上的乙酰取代基团，瑞氏木霉 *T. reesei* 产生两种乙酰木聚糖酶，分子量均为 34kDa，pI 分别为 6.8 和 7.0，都是糖蛋白。从嗜热厌氧杆菌 (*Thermoanaero bacterium sp. JW/SL-YS485*) 中分离到乙酰木聚糖酯酶 I 和 II，酶 I 在细胞外作用于木聚糖上的乙酰取代基团，酶 II 在细胞内作用于寡聚木糖上的乙酰取代基团。该酶可以消除乙酰基团对内切木聚糖酶作用的空间阻碍，增强内切木聚糖酶对木聚糖的水解力。

1.1.2.6 酚酸酯酶 (phenol acid esterases)

该酶主要包括香豆酸酯酶和阿魏酸酯酶，前者切除香豆酸和阿拉伯糖残基之间的酯键，后者切除阿魏酸和阿拉伯糖残基之间的酯键。新美丽丝菌 *Neocallimastix MC-2* 产生两种阿魏酸酯酶 FAE I 和 FAE II，均为单亚基蛋白，分子量 68kDa 和 24kDa，pI 分别为 4.2 和 5.7，最适 pH 分别为 6.2 和 7.0，该真菌还产生一种香豆酸酯酶，分子量 11kDa，pI 4.7，最适 pH 7.2，

该酶活力受多种离子的影响。

由于木聚糖降解酶普遍存在于自然界并且种类繁多,因此,对于微生物所产的木聚糖酶研究报道很多。据 Gilbert (1993) 和 Haapala (1994) 报道,目前人们研究和应用得最多的是细菌、曲霉和木霉来源的木聚糖酶。在真核生物中,木聚糖酶的糖基化是一个普遍存在的现象,1998年,Wong 发现这些糖类基团一般与蛋白质共价连接或与木聚糖酶形成可解离的复合物,糖基化作用可能赋予酶分子稳定性以抵抗不良环境,这类糖残基主要是甘露糖、葡萄糖和果糖,对不同来源的木聚糖酶的研究已经证实了木聚糖酶的多样性。根据许多糖苷键水解酶催化区域的氨基酸序列组成和疏水族分析,可将其分成许多族 (Family)。所有的木聚糖酶都属于 F/10 或 G/11 族 (Davis, 1995),从生化结构和特性而言,两族酶并无多大关系。

另外,还有很多研究者报道了木聚糖酶的交叉活性。所谓酶的交叉活性是指一种酶具有多种催化活性,如一种酶可催化木聚糖水解,因此它是木聚糖酶,但同时它又可以催化羧甲基纤维素 (CMC) 水解,即它又具有羧甲基纤维素酶 CMC 活性,由此认为这种酶具有交叉活性。Shei (1985) 和 Lee (1987) 等先后发现有一些木聚糖酶具有多种交叉活性,而且有些木聚糖酶的第二或第三种活性还很高。

1.2 木聚糖酶的理化性质

微生物来源的木聚糖酶的分子量为8~145kDa,只含一个亚基。一般来说,分子量小于30kDa的木聚糖酶为碱性木聚糖酶,通常含有182~234个氨基酸残基;而分子量大于30kDa的木聚糖酶为酸性木聚糖酶,通常含有269~809个氨基酸残基。木聚糖酶以可溶或不可溶性的木聚糖为底物,但不同的木聚糖酶对底物的要求有所不同。木聚糖酶有非特异性木聚糖酶和特异性木聚糖酶,特异性木聚糖酶只作用于木聚糖底物。非特异性的木聚糖酶除了可作用于木聚糖外还可作用于纤维素和人工底物,为双功能酶。对于这两种酶的不同,有人认为反映了它们活性位点的不同,但这更可能反映了两底物结合基团的不同,而不是催化基团的不同 (张红莲, 2002)。

不同生物来源的木聚糖酶所能耐受的pH值的范围一般是3~10。一般来说,真菌来源的木聚糖酶pH值在4~6的范围内最有效。1998年,Maximo

等研究发现来源于放线菌和细菌的木聚糖酶pH值则在5~9的更广范围内有效。木聚糖酶的最适pH与同酸/碱催化剂形成H键的天冬氨酸(Asp)/天冬酰胺(Asn)残基之间存在着显著相关性,即在酸性木聚糖酶(pH<5.0)中,此残基为Asp,而在最适pH较碱性的木聚糖酶(pH>5.0)中为Asn。

来源于细菌和真菌的木聚糖酶的最适作用温度一般在40℃~60℃之间,迄今为止,只发现20余种细菌和不足10种真菌能产耐热木聚糖酶。木聚糖酶的热稳定性与多种因素和结构参数相关:热稳定性与精氨酸(Arg)和脯氨酸(Pro)的含量有关;蛋白结构中二硫键的引入和盐桥的形成;带电侧链和螺旋偶极子的疏水堆积及芳香族氨基酸有利的相互作用有关(杨浩萌等,2005),但不一定由相同的结构因素决定。胱氨酸(Cys)在木聚糖中并不常见,在已知的81种G/11家族木聚糖酶氨基酸序列中只有117个胱氨酸,占氨基酸总数的0.7%,其中的27个序列没有胱氨酸,14个序列只有1个胱氨酸,因此其中至少有一半的木聚糖酶分子中没有二硫键。这些研究表明,二硫键对G/11家族木聚糖酶的嗜热性并不重要。在细菌性木聚糖酶中,普遍存在着与催化功能无关的重复结构域,其中之一是热稳定性结构域。木聚糖酶的热稳定性与其蛋白质N-末端的结构域有关,并且木聚糖酶的热稳定性结构域与起催化结构域相关。大量研究表明,嗜热性微生物F/10家族木聚糖酶有一个共同的特征,即结构域提高了其热稳定性,然而在G/11家族中并未发现非催化结构域赋予木聚糖酶热稳定性,这可能是因为它们天生具有热稳定性。

金属离子对不同来源的木聚糖酶的活性的影响各不相同。来源于*Trichoderma*和*A.niger*的木聚糖酶的活性受 Hg^{2+} 的抑制;而 Ca^{2+} 则激活*A.niger*的木聚糖酶的活性;来源于*A.lavatus*的木聚糖酶的活性受 Co^{2+} 和 Cu^{2+} 的抑制;来源于*A.phoenicis*的木聚糖酶的活性受 Ag^+ 、 Hg^{2+} 、 Mn^{2+} 的抑制(Gilbert,1993)。不同离子之间的相互作用对木聚糖酶的活性也有影响。

木聚糖酶通常有十分特异的差向异构性,只水解 β -1,4-糖苷键,且两侧都是 β -1,2-糖苷键,另外 β -1,4-糖苷键连接的片段长度对酶的活性也有影响,要求有4个或4个以上的糖(Sunna,1997)。

大多数的内切木聚糖酶作用于复杂的多糖时活性极低,因为复杂的多糖有丰富的支链如阿拉伯糖、葡萄糖醛酸和乙酰基可能阻碍了木聚糖酶的

内切作用。但*A. niger*来源的两个非脱支链的同工异构酶，则对线性的寡聚木聚糖活性很低，且对无阿拉伯糖分支的不溶性糖无活性，故推测该酶作用位点在木聚糖的骨架靠近分支点附近 (Ball, 1989)。

1.3 木聚糖酶的研究进展

1.3.1 木聚糖酶的诱导和抑制

能够降解半纤维素的微生物广泛存在，已知的可产生半纤维素酶的微生物有几十个属，一百多种，其中包括细菌、放线菌和各种真菌，甚至瘤胃微生物。具有纤维素、半纤维素分解能力的微生物有瑞氏木霉 *T. reesei*、绿色木霉 *T. viride*、康氏木霉 *T. koningii*，酵母中的丝孢酵母 *Trichosporon*、隐球酵母 *Cryptococcus* 也能够分解半纤维素，另外胞外半纤维素酶活力较强的微生物还有曲霉、枯草杆菌和厌氧的梭状芽孢杆菌。已经有报道黑曲霉 *A. niger*、烟色曲霉 *A. umigatus*、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*、短小芽孢杆菌 *B. pumilus*、多孢丝孢酵母 *T. cutanem*、白色隐球酵母 *C. albidus* 和木霉属 *Trichoderma* 等许多种的半纤维素酶进行过较为详细的研究，而对木聚糖酶的研究最为深入。

高产量生产木聚糖酶的关键是选择适合的木聚糖酶高产菌株、适合的诱导底物及最佳的培养基组成和培养条件 (周德庆, 2002)。在发酵过程中，微生物所分泌的木聚糖酶量的大小受很多因素的影响。Kulkarni (1999) 研究发现影响因素主要包括酶作用物的易感性、低聚木糖的释放速率和释放量、释放木糖的木聚糖的化学性质及其数量。在自然状态下，木聚糖酶是诱导酶，高效生产木聚糖酶的关键因素是选择合适诱导底物和最佳的培养基组成。Berenger (1985) 对梭状芽孢杆菌 (*Clostridium stereorarium*)，Stutzenberger (1992) 对耐热单孢菌 (*Thermomonospora curvata*)，Deshpande (1986) 对 *Neurospora curcata* 研究发现，若要获得较高活性的木聚糖酶，在培养基中纤维素类物质则是不可缺少的。Haltrich (1996) 和 Dey (1992) 用廉价的农业废弃物等木质纤维原料，如玉米芯、麸皮、米糠、玉米秆和甘蔗渣对于某些微生物的菌种，如曲霉 (*Aspergillus awamori*)、青霉 (*Penicillium purpurogenum*) 和耐碱耐热杆菌 (*Bacillus sp.* NCIM 59) 等，作为产生木聚糖酶的碳源和诱导物是非常适合的。1995 年，Purkarthofer 对嗜热真菌 *T.lanuginosus* DSM5826 的诱导机制进行了研究，发现在嗜热

真菌木聚糖酶诱导合成过程中,木糖同时扮演着两种角色:诱导因子和抑制因子。在试验中,一次加入大剂量的木糖溶液和将同样剂量的木糖溶液分七次加入作对比,发现分次加入的木聚糖酶产量接近木聚糖诱导的水平,而一次加入的产酶水平却很低。说明木糖在低剂量时诱导产生木聚糖酶,浓度高时却抑制酶的合成。

在较少情况下纤维素能够在木聚糖酶的产生过程中起到诱导作用,但目前仍不清楚诱导作用是来自纤维素还是来自木聚糖的碎片。另外,采用结晶纤维材料作为产酶诱导物时,链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 所产的木聚糖酶活性可以得到显著提高 (Morosoli, 1986); 蔗渣是 *Cellulomonas vigena* 产生木聚糖酶和木糖苷酶的最佳诱导底物 (Perez-Avalos, 1996); 松树来源的木聚糖为底物诱导曲霉属微生物产生的木聚糖酶之稳定性高于其它来源木聚糖的诱导产物 (Raquel, 1997)。从分子水平上对于木聚糖酶的生物合成和酶诱导现象的研究还比较少。木糖的存在能够使芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*, 链霉菌 *Streptomyces livuians* 66 及 *Aureobasidium pullulans* 得到较高的木聚糖酶活性 (Kluepfel, 1990; Paul, 1990); 木糖并不影响耐温放线菌 *thermophilic actinomycetes* 产生木聚糖酶, 但却抑制隐球菌 *Cryptococcus albidus* 木聚糖酶的产生 (McCarthy, 1985)。木二糖是木霉 *T. reesei* 和曲霉 *Aspergillus terreus* 产生木聚糖酶的特殊诱导底物 (Hrmova, 1986), 木二糖异构体也能诱导酵母和真菌木聚糖酶的产生, 并且菌株的产酶水平在以木二糖异构体作为诱导物时为高, 这显示异构化的木二糖不是菌株产生木聚糖酶的直接诱导物。

1.3.2 木聚糖酶的研究现状

不同微生物产生的木聚糖酶通常在较广的 pH 值, 即 pH 值 3~10 范围内稳定, 而最适 PH 值范围是 4~7, 但真菌如黑曲霉 *A. niger* (Ito, 1992) 和青霉菌 *Penicillium herque* (Funajuma, 1991) 所产木聚糖酶的最适 pH 值范围则在 2~6 的酸性区域。细菌和真菌产木聚糖内切酶的最适温度范围是 40℃~60℃, 真菌产木聚糖酶的耐热性通常比细菌产木聚糖酶差一些。嗜热性细菌 *Gthermotoga sp.* 生产的木聚糖酶甚至在 100℃、pH 值 5.3 的条件下具有最高酶活力 (Simpson, 1991)。

真菌由于能够胞外分泌木聚糖酶而且产酶水平高于酵母和细菌而格

外引人关注,真菌木聚糖酶的产生往往是和纤维素酶的产生相联系的。国内的研究者在真菌木聚糖酶方面做了相当多的研究工作,主要集中在真菌所产的中温中性或偏酸性木聚糖酶。国内所研究的高温耐碱性芽孢杆菌 (*Bacillus Sp. L29*) 产酶能力不高,在优化的培养基条件下仅产生 4.92 U/mL 的酶活力(蔡敬民,1996);在耐热木聚糖酶研究方面,仅有克隆并在大肠杆菌中表达海栖热袍菌 MSB8 (*Thermotoga maritima* MSB8) 的 *xynB* 基因的报道(江正强,2002)。国外在耐热木聚糖酶方面的研究相当活跃,在嗜热真菌木聚糖酶方面的研究成果尤其突出。现有的研究报道表明, *Talaromyces byssochlamydoides* (Yoshioka, 1981), *T. emersonii* (Tuohy, 1992), *Thermoascus aurantiacus* (Yu, 1987) 等都是耐热木聚糖酶生产菌株。

真菌所产木聚糖酶的活性通常要高于细菌产的木聚糖酶。Haltrich (1993) 报道,真菌 (*Schizophyllum commune*) 所产生的木聚糖酶活性最高,以微晶纤维素为碳源和诱导物,摇瓶培养 11 天的酶活性达到 5740U/mL;嗜热真菌 (*Thermomyces lanuginosus*) 以玉米芯为碳源,摇瓶发酵 7 天所产生的木聚糖酶活性最高达到 3569U/mL (Singh, 2000)。国内研究报道中,山东大学报道 *Bacillus pumilus* A30 产木聚糖酶最高活力为 431U/mL(曲音波,1999), *Aspergillus niger* E149 最高酶活力为 375.2U/mL (陈红歌,1999)。在固体培养条件下,真菌 (*Schizophyllum commune*) 可以产生 22700U/g 干基的木聚糖酶 (Haltrich, 1992);木霉 (*Trichoderma hamatum*) 用麦秆作为诱导物时可产生 7000U/g 干基的木聚糖酶 (Grajek, 1987)。

目前已经证实了作为木聚糖酶诱导物的低分子量物质需要转移酶的作用才能被转送进入细胞质,因此诱导物的浓度水平以及培养液中所需的酶量都会影响微生物木聚糖酶的合成 (Kulkarni, 1999)。影响木聚糖酶产量的因素还有很多,培养基条件如合适的碳源、氮源以及碳氮比例、初始 pH 值等,培养条件如温度、接菌量以及溶氧等等。其它影响微生物木聚糖酶产生的因素除了通常的发酵条件之外,还有一些关键的影响因子:底物的可接近性,低聚木糖的释放速率、数量及其化学特性,还有所能够产生的木糖量等等。木糖在较多情况下作为碳源时对木聚糖酶的形成有抑制

作用,诱导物分子的缓慢释放或在发酵液中转变成为不能代谢的衍生物都能提高微生物木聚糖酶的产量,所有这些影响因子对于微生物木聚糖酶的表达分泌具有综合效应。此外,木聚糖酶与底物结合的紧密程度也会影响到微生物木聚糖酶的产量。若酶与底物结合紧密,则会有一部分木聚糖酶因结合在不溶性底物上而在处理酶液时被丢弃。还有,微生物菌体本身代谢所产生的酶(如蛋白酶和糖苷转移酶),也都会影响到木聚糖酶的产量。影响木聚糖酶活性和产量的其它生物过程参数还包括 pH、温度以及通风情况等等。

1.4 木聚糖酶的应用

近年来,木聚糖酶在食品、饲料、及造纸等行业都有广泛的应用,如用于食品工业的面团改良剂及功能性低聚木糖的生产、制浆造纸工业中的纸浆生物漂白,以及饲料工业的饲料添加剂等(Wong K, 1992; 朱静等, 1996)另外,木聚糖酶还可以应用于果汁和葡萄酒的澄清、香料和色素的提取、植物油和淀粉的生产等等。

1.4.1 木聚糖酶在饲料工业中的应用

中国已经发展为世界第一畜牧大国,第二饲料大国,所取得的辉煌成就举世瞩目。饲料工业是畜牧业发展的基础,国内年生产总值超过 2000 亿元,已经成为我国经济的支柱产业之一。农业生物技术正在成长为二十一世纪全球最有发展潜质的行业之一。我国政府在国民经济与社会发展计划纲要中指出利用生物技术发展生态节粮型畜牧业则是农业实现科技化、产业化和可持续发展的重点,这也符合我国关于创建节约型社会的要求。微生物酶制剂作为一类绿色安全的饲料添加剂,应用到各种动物的养殖领域。大量实验证明,在节约饲料用粮、提高饲料利用率、改善养殖环境、拓展饲料资源方面具有明显的效果。目前市场上的饲料酶主要为分为两类(刘亚力, 1999):一类是消化酶类,主要是补充动物内源消化酶的不足,如蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等;另一类是非消化酶类,主要是通过该类酶使动物能够利用原本无法利用或利用率极低的物质,主要包括非淀粉多糖酶和植酸酶。

非淀粉多糖(Non-starch polysaccharides, NSP)是指植物的结构多糖的总称。非淀粉多糖不被消化道中酶所降解,遇水形成胶态溶液,使食糜

粘度升高,阻碍消化酶与养分的充分混合,从而影响了营养物质的吸收。植物中的多糖分为贮存多糖(主要是淀粉)和结构多糖,在一般情况下,对于单胃动物而言,贮存多糖具有营养作用,而结构多糖则有抗营养作用。在动物营养的分类上,结构多糖一般属于粗纤维(粗纤维包括非淀粉多糖和木质素)。纤维素是 β -1,4-糖苷键连接而成的直线分子,键间葡萄糖的羧基之间既已形成氢键,加上半纤维素、果胶、木质素的粘结作用,使得完整的纤维素具有高度水不溶性。纤维素的分子量较高,约有8000~10000个葡萄糖残基组成,除反刍动物,单胃动物肠道缺乏分解纤维素的酶,不能吸收消化纤维素,因此造成资源浪费,另外纤维素形成一种屏障阻止胃肠道消化酶对各种营养物质的有效接触,降低了营养物质的利用率。半纤维素包括许多高分子的多糖,是多聚戊糖(木聚糖和阿拉伯聚糖)和己糖(甘露聚糖、 β -葡聚糖和半乳聚糖)的混合物, β -(1,3-1,4)-葡聚糖以及 β -1,4-木聚糖是半纤维素的主要成分,木聚糖广泛的存在于谷物中细胞壁中,而麦类细胞壁主要含有较高的戊聚糖。表2列出了不同谷物饲料中抗营养因子的含量,从表(孔键,2005)中可以看出木聚糖在谷物抗营养因子中所占的比例较大,因此饲料酶中最重要的是木聚糖酶。

表2 不同谷物饲料中抗营养因子的含量

Table 2 Content of antinutrition factor in grain feed

种类	β -葡聚糖(g/kg DM)	木聚糖(g/kg DM)	总计
高粱	1	28	29
玉米	1	43	44
小麦	5	61	66
黑麦	12	89	101
大麦	33	76	109

具有抗营养意义的是水溶性非淀粉多糖(包括半纤维素和果胶),其中最重要的抗营养因子是 β -葡聚糖和阿拉伯木聚糖(或称为戊聚糖)。此外,甘露聚糖(葡萄甘露糖、半乳甘露聚糖)等也具有一定的抗营养作用。水溶性非淀粉多糖不仅本身不具有实质意义的营养作用(尤其是5碳的戊聚糖),同时干扰整个日粮其他组分的营养消化吸收和利用(Classen,

1996)。非淀粉多糖的抗营养作用与它在消化道产生粘性有关 (Choct, 1995)。大麦中的 β -葡聚糖高达 66% 溶于水 (Chesson, 1993)。用水浸泡大麦可以减少 β -葡聚糖以及降低它的粘性, 这证实了大麦粘性来源是由于它的 β -葡聚糖 (Svihus, 1997)。另一种重要的水溶性 NSP 是阿拉伯木聚糖, 在小麦和黑麦中含量很高, 小麦含阿拉伯木聚糖为 50~80g/kg DM, 而黑麦则超过 100g/kg DM (Choct, 1995)。这两种多聚糖都产生粘性, 影响营养消化, 尤其是脂肪的消化吸收。水溶性非淀粉多糖在消化道吸水形成胶状溶液, 逐渐形成大分子, 进而与食糜形成大凝胶团, 阻碍饲料营养物质与消化液的接触。同时, 与消化酶结合, 形成复合物, 降低消化酶的活性, 造成消化不良, 最后导致小肠发生功能性病变。

通过生物技术的方法, 如使用微生物产生的酶制剂可以水解许多抗营养因子, 这方面最成功的例子是 β -葡聚糖、阿拉伯木聚糖酶以及植酸酶的应用 (Classen, 1996)。许多试验证实, 在以小麦为基础日粮的饲料中使用木聚糖酶, 可以明显改善生产性能 (Marquardt, 1994; Choct, 1995; Weldman, 1994; Steinfeldt, 1995)。同样, 在黑麦日粮中添加木聚糖酶, 也可以提高黑麦的营养价值 (Marquardt, 1994; Boros, 1998)。在高小麦的日粮中 (80%) 使用木聚糖酶, 可使表观氮校正代谢能提高 4%~7%, 食糜的粘度由 48.8CPS 降至 9.3~20CPS (使用不同商品酶的差异)。另外, 加酶以后, 盲肠内容物的 pH 值显著下降, 这是由于酶使 NSP 降解, 部分易于被微生物发酵 (Steenfeldt, 1998)。

1.4.2 木聚糖酶在食品工业中的应用

小麦面粉中的阿拉伯木聚糖含量很少, 约为 1.5%~2.5% (Courtin, 2002) 水溶性的阿拉伯木聚糖更少, 约为木聚糖总量的 25%~30%。尽管小麦面粉中阿拉伯木聚糖量很少, 其在焙烤过程中所起的作用却不容忽视。目前, 国外对于木聚糖酶应用于面包焙烤工业的研究报道很多, 主要是针对小麦粉中的阿拉伯木聚糖, 向面粉中添加木聚糖酶作为品质改良剂, 改善面团的稳定性和对过度发酵的耐受性, 提高入炉急涨性能, 增大烘烤后面包体积 (Courtin, 2001; Sprossler, 1997)。Haros (2002) 等研究了添加不同水解酶对面包品质的影响, 发现木聚糖酶确能改善新鲜面包芯的硬度, 降低面包老化速度; 添加木聚糖酶之后面包的老化速度变缓,

即木聚糖酶改善了烘烤后面包的硬度，降低可面包的老化速度，延缓了面包的老化过程。另外，Martinez-Anaya (1997) 等和 Laurikainen (1998) 等的研究也证实了添加木聚糖酶能够降低面包的老化速率；相反地，也有报道称木聚糖酶不能影响面包的老化速率，但却能通过增加面包体积从而降低了新鲜面包芯的硬度 (Rouau X, 1994)；另外，Gil 等 (1999) 的研究却表明添加纤维素酶对面包的硬度和老化速度均没有明显的影响。众多研究报告普遍认为：增加面粉中的水不溶性阿拉伯木聚糖的含量不仅会影响面团的性能，导致面包体积的减小而且影响面包芯的质地，从而使面包品质恶化 (Ktishnaray L 等, 1994)，因此，在面粉中添加适量的木聚糖酶使水不溶性阿拉伯木聚糖增溶，增加了面团的粘度 (Rouau X, 1993)，另外，木聚糖酶降低了水不溶性阿拉伯木聚糖的交联程度，使之溶胀和吸收更多的水分 (Gruppen H, 1993)；Biliaders (1995) 等研究发现，在面粉中添加少量的水溶性阿拉伯木聚糖 (0.5%) 能够增大面包的体积 (Biliadweis C G, 1995)。总之，水溶性阿拉伯木聚糖利于面包品质的改善，而水不溶性阿拉伯木聚糖则有不利的影响。

木聚糖酶在食品行业的应用，还体现在它能从棉壳、甘蔗渣、玉米皮芯等天然食物半纤维中分解得到低聚木糖。低聚木糖是由2~7个木糖以 β -1,4糖苷键连接而成的低聚糖，该糖的特点与功能是：具难消化性，低热量而不会导致肥胖；有很高的双歧菌增殖活性，是肠内双歧菌的活化增殖因子；是难发酵性糖，因此不易造成龋齿。另外，用低聚木糖可制成不同甜度的食品，可代替葡萄糖作为糖尿病人的疗效食品。同时，低聚木糖作为一种食品添加剂，有着用量小、风味良好，无致癌性而且低热量等诸多优点，十分适宜在减肥食品中添加。

果汁中含有的一些多糖类物质可影响其透明度，而木聚糖酶则可以降解这些多糖，有利于果汁的澄清；在奶油和果冻生产中，加入木聚糖酶可提高产品的乳化性；在葡萄酒和日本大麦烧酒的生产中，发现该木聚糖酶能够提高发酵效率，增加酒精产率；在啤酒生产中，木聚糖酶可与 β -葡聚糖酶协同作用，有效解决由 β -葡聚糖和木聚糖引起的啤酒混浊和啤酒过滤时滤膜堵塞问题。

1.4.3 木聚糖酶在造纸工业及其生物转化中的应用

在制浆造纸工业方面,木聚糖酶的应用非常广泛—用于预漂纸浆,改善其漂白性能,提高木素溶出率;减少化学漂剂用量,并可改善纸张特性等等(Roberts J C, 1990)。

木聚糖酶可应用于纸浆漂白中,是在1986年由芬兰科学家Viikari等(Viikari L, 1986)首次提出。木聚糖酶最重要的应用是牛皮纸浆的预漂白,酶的应用可改善纸浆的原纤维形成和持水性,减少原始纸浆的打浆次数,恢复再生纤维的联结和增加游离性,以及从溶解的纸浆中选择性地去除木聚糖。从溶解的纸浆中产生纤维素、在生产人造纤维以及对木浆进行生物漂白等方面,木聚糖酶也有很多用途(Srinivasan M C, 1999)。国内外科学家对木聚糖酶辅助漂白机理进行了大量的研究,提出了四种助漂假设:

第一,木聚糖酶能够有效的降解蒸煮过程中再吸附和沉积在纤维素表面的木聚糖,使漂剂更好地接近残余木质素,从而使木质素更容易从纸浆纤维中脱除。经木聚糖酶处理后的纤维的渗透性增强,有利于化学漂剂的渗透和内部木质素的降解。

第二,木聚糖酶催化作用于纸浆纤维中的木聚糖,使纤维细胞壁润胀而结构变得疏松,从而使木质素容易被抽提出来。Clark等(1991)用显微镜观察了经木聚糖酶和甘露糖酶处理后的纤维断面发现细胞壁发生润胀而结构疏松,认为木聚糖酶的作用在于降解了纸浆中的半纤维素而使纤维细胞壁结构变得疏松,从而使木质素容易被抽提出来。

第三,木聚糖酶降解掉与纸浆残余木质素连接的半纤维素,破坏了木质素碳水化合物(LCC),增大了纤维间的孔隙,从而有利于已溶解木质素的脱除。

第四,木聚糖酶能有效地除去在蒸煮过程中产生的衍生物—己烯糖醛酸木聚糖(Teleman A, 1995)。在硫酸盐蒸煮过程中,木聚糖分子的甲基-葡萄糖醛酸,在测定卡伯值(纸浆脱木素程度的指标)时己烯糖醛酸会消耗一定量的高锰酸钾,致使卡伯值升高,在木聚糖酶预漂白过程中,木聚糖酶除去这一发色团要比漂白试剂更为有效。

另外,用于漂白的木聚糖酶必须具备以下的一些基本特征:一是分子

量要小，因为它必须穿过木浆纤维达到它要作用的底物，从而降解底物，释放有色基团和木质素；二是要有合适的最适反应pH值，因制浆过程是在碱性环境中进行的，纸浆是碱性的，故用于对纸浆进行漂白的木聚糖酶必须是碱性酶，以保证在这样的环境中它能起作用；第三，木聚糖酶必须有碱性的pI值，以保证它能结合到带负电荷的木浆纤维表面。

在纤维素水解酶类和木聚糖酶的共同作用下，造纸工业废料及农业废弃物中的木聚糖可被转化为D-木糖单体。而D-木糖单体又可被细菌、酵母及真菌转化为有价值的燃料和化工原料，各种微生物利用D-木糖的能力存在很大差别，细菌的酶系统可特异的将D-木糖转化成多种产物，包括醇类（丁醇，乙醇，异丙醇，2,3-丁二醇）；有机酸（乙酸，丁酸，延胡索酸，乳酸）；多元醇（阿拉伯醇，丙三醇，木糖醇）；酮类（丙酮）；或气体（甲烷，二氧化碳，氢气）。其中，许多产物还可进一步转化成更高级的燃料，以及作为生产大量有价值的化工产品，如合成橡胶，聚酯塑料等的原料。

1.5 主要研究内容和目标

一般地，在酶制剂的生产过程中，碳源的成本是影响生产成本的重要因素。因此，选择适宜的碳源是木聚糖酶生产成败的决定因素。1991年，Beily等研究证明，木聚糖能够专一性地诱导许多丝状真菌合成和分泌木聚糖酶，是生产木聚糖酶极好的碳源，但是由于木聚糖制备方法复杂，成本很高，实际生产上应用价值不大，因此相当多的研究倾向于寻求天然原料来生产木聚糖酶，而木质纤维原料尤其是一些廉价的农业废弃物，如麦草、麸皮、秸杆、蔗渣、玉米秸杆、玉米芯等，因其富含木聚糖和纤维素，可作为工业化生产木聚糖酶制剂的碳源而受到研究者的重视。

真菌木聚糖的生产可采取固体发酵和液体发酵两种途径。虽然针对真菌液体发酵产酶条件的研究较多，方法较为成熟，但由于固体发酵存在很多优点，而在真菌酶制剂的实际生产中具有很大的竞争优势（Weiland P, 1988）：利用固体发酵，单位体积的培养基的生产能力大大高于液体培养基（Grajek W, 1987），同时对工厂、机械设备和能源等的要求不高，操作成本很低（Roche, 1994）；另外，由于培养基含水量小，减少了污染杂菌的机会。因此，固体发酵有可能成为农业废弃物直接应用于生物降解

和生物转化成为有价值产品的途径之一。本试验采用固体发酵的方法，研究了黑曲霉C-2的固体发酵条件及部分酶学性质，实验室托盘发酵和中试工艺的参数，还进一步试验了该木聚糖酶制剂的动物饲喂效果。具体研究内容及方法如下：

(1) 固体发酵培养基及发酵条件的优化

首先筛选出影响菌株固体发酵生产木聚糖酶的碳源和氮源，然后进一步试验选出最佳且利于工业化生产的复合碳源和氮源的组成。

对影响菌株固体发酵生产木聚糖酶的料水比、培养基初始pH值、发酵温度及接种量等因素进行了详细的探讨与研究，深入探讨农业废弃物等木质纤维原料直接应用和生物转化的途径，寻求工业化生产木聚糖酶制剂行之有效且成本低廉的方法。

(2) 木聚糖酶的酶学性质

研究该木聚糖酶的最适pH值及pH对其稳定性的影响，最适温度及温度稳定性，金属离子对木聚糖酶酶活力的影响，为木聚糖酶的应用提供基础数据。

(3) 托盘发酵工艺研究

研究托盘固体发酵产木聚糖酶的工艺参数，包括固体种曲的接种量、托盘载曲量、培养基初始水分含量及发酵过程补水对产酶影响；以及发酵结束后的烘干温度对酶活力的影响、粗酶制剂在不同温度下的干热耐受试验。为实际应用提供更有利的工艺参数。

(4) 中试工艺参数的研究

把固体发酵工艺在种曲机进一步扩大，适当调整，检测发酵结束后的产酶情况。

(5) 木聚糖酶制剂在动物饲喂中的应用

在同批出栏的小猪日粮中添加等量的木聚糖酶制剂和购买的木聚糖酶产品，并且以不添加任何酶制剂的日粮作对照，试验该木聚糖酶制剂对小猪生产性能的影响，为该木聚糖酶在饲料中的实际应用奠定理论基础。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌种

黑曲霉 (*Aspergillus.niger* C-2) 为实验室保藏菌种

2.1.2 原料

玉米芯粉、麸皮、甘蔗渣、土豆、蛋白胨、酵母膏、棉粕、啤酒糟等；均为市购。

尿素：工业级。

K_2HPO_4 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 $NaNO_3$ 为分析纯，TW-80 为化学纯。

2.1.3 试剂与溶液

2.1.3.1 0.2mol/L 的缓冲液

柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，pH2.18~4.12；

醋酸-醋酸钠缓冲液，pH3.80~5.72；

MES 缓冲液，pH5.18~7.10；

Tris-HCl 缓冲液，pH7.0~9.0；

各种金属盐

螯合剂 (EDTA)

2.1.3.2 1% (w/v) 木聚糖标准溶液

称取木聚糖 (Sigma 公司) 1.00g，加入 0.2mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH4.6) 加热溶解，并不断搅拌，直到溶液透明。停止加热，冷却至室温后，定容至 100mL。4℃避光保存，使用前适当摇匀。

2.1.3.3 DNS 试剂

称取 6.3g 3,5-二硝基水杨酸用水溶解，加入 21.0g NaOH，182g 酒石酸钾钠，加 500mL 水，加热溶解后，在加入 5.0g 重蒸酚和 5.0g 亚硫酸钠，搅拌溶解，冷却，定容至 1000mL。存于棕色瓶中，放置 7 天后使用。

2.1.3.4 木寡糖

山东龙力生物科技有限公司，纯度 95%。

2.1.4 主要仪器设备

名 称	产 地
DHG 型电热干燥箱	山东潍坊医疗器械厂
303A 电热恒温培养箱	江苏省启东市实验仪器厂
海尔电冰箱	青岛海尔集团
YXQG-02 高压锅	山东新华医疗器械厂
YJ-87513 超净工作台	上海阳光实验仪器有限公司
HW-SY21-K 水浴锅	北京市长风仪器仪表公司
FA1004 电子天平 1/1000	上海天平仪器厂
UV-2000 型紫外可见分光光度计	尤尼柯(上海)仪器有限公司
PHS-3C 型精密 pH 计	上海精密科学仪器有限公司
TGL-16G 离心机	上海安亭科学仪器厂
SC69-02C 型水分测定仪	上海精密科学仪器有限公司
XSS-600 光学显微镜	山东光电仪器厂
种曲机	自制

2.1.5 培养基

2.1.5.1 保藏斜面培养基

察氏培养基。

2.1.5.2 复壮培养基—麸皮汁培养基

麸皮 10%、葡萄糖 2%、琼脂 1.5%。麸皮加适量水煮沸 20min，纱布过滤，补足水分。

2.1.5.3 种子培养基—麸皮培养基

麸皮 100%，按料水比 1:0.9 加水。

2.2 实验方法

2.2.1 接种和培养

2.2.1.1 制备孢子悬液：把适量种曲加入到适量无菌水中，置摇床上摇 30min，制成孢子悬液 (10^9 cfu/mL)。

2.2.1.2 培养：在 500mL 三角瓶中加入 20g 培养基原料和适量比例的水分，拌匀，在 121℃ 灭菌 30min，冷却后按每瓶 2mL 孢子悬液接种，搅拌均匀

后，于 30℃ 培养 36h，期间翻曲 2~3 次。

2.2.2 木聚糖酶活力的测定

2.2.2.1 木糖标准曲线的绘制

吸取水 2.0mL，加入 DNS 试剂，沸水浴加热 5min，用自来水冷却至室温，用蒸馏水定容至 25.0mL，制成标准空白样。

取 25mL 具塞刻度试管 8 支，分别加入 10.0μmol/mL 的木糖标准溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8mL，加蒸馏水 1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2mL，加 DNS 试剂 1.5mL，混匀后在沸水浴中加热 5min，取出立即用冷水冷却，用水定容至 25mL，摇匀，在 540nm 下测吸光度 A，以吸光度为纵坐标，木糖的含量为横坐标，绘制标准曲线。

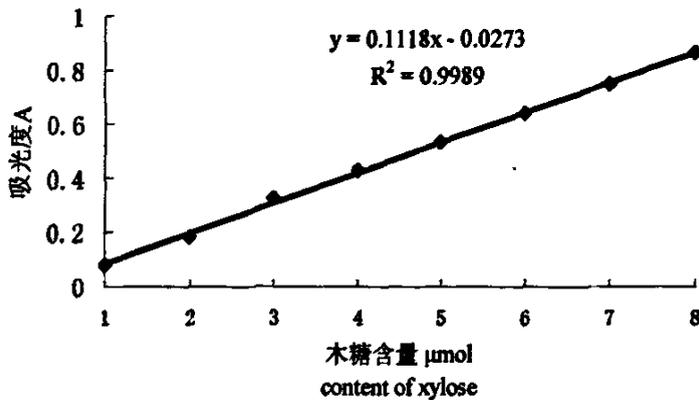


图 4 木糖的标准曲线
Fig. 4 Standard curve of xylose

2.2.2.2 木聚糖酶活力的测定

a、木聚糖酶活力单位 (U) 的定义

在温度 50℃，pH4.6 的条件下，每分钟水解木聚糖生成 1μmol 还原糖（以木糖计）的酶量，即为 1 个酶活力单位 U。

b、粗酶液的制备

每克固态培养物加入 50mL pH4.6 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液，在室温下浸提 1h，离心 15min，上清液即为木聚糖酶粗酶液。

c、木聚糖酶活力的测定

(3) KH_2PO_4 对菌株产酶的影响

在确定碳氮源的基础上，培养基中添加不同比例的 KH_2PO_4 (0.1%、0.2%、0.3%) 进行菌株产酶试验。

(4) TW-80对菌株产酶的影响

在确定碳氮源的基础上，向培养基中添加不同比例的 TW-80 (0.1%、0.3%、0.5%) 进行菌株产酶试验。

(5) 培养基料水比对菌株产酶的影响

在优化碳氮源的基础上，按照不同的料水比(培养基干料与盐溶液的比例)进行菌株产酶试验。料水比水平分别为 1:0.8、1:1.0、1:1.2、1:1.4、1:1.6、1:1.8。

(6) 培养基最适初始 pH 值的确定

在优化碳氮源和确定料水比的基础上，以盐酸或氢氧化钠调节培养基的初始 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0，固体培养 36h 后测定酶活力。

2.2.3.2 发酵条件的优化

(1) 培养温度对菌株产酶的影响

在优化碳氮源的基础上和确定料水比及培养基初始 pH 值之后，采用不同温度 (20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃) 对菌株进行固体发酵培养，寻求菌株产酶的最佳温度。

(2) 最佳接种量的确定

按照上述方法制备孢子悬液，量取不同体积的孢子悬液 (0.1mL、0.2mL、0.4mL、0.6mL、1.0mL、2.0mL、3.0mL、4.0mL)，然后将其无菌移入灭菌后的培养基接种，在上述条件下培养后测定酶活力。

(3) 装料量对产酶的影响

在 500mL 三角瓶中分别以 10、15、20、25、30g 的装料量，探索装料量与产酶的关系，其它组分、培养条件不变，发酵后测定酶活力。

(4) 培养时间对产酶进程的影响

用优化后的培养基和产酶条件下进行培养时间与产酶进程试验，每隔 16h 测定一次培养基中木聚糖酶的活力。

2.2.4 木聚糖酶的酶学性质研究

2.2.4.1 木聚糖酶的最适 pH 值和 pH 稳定性

最适 pH 值的测定：采用不同缓冲体系配成一系列浓度为 0.2mol/L 缓冲液，pH 值范围为 2.18~9.0，缓冲体系和 pH 范围分别为：柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，pH2.18~4.12；醋酸-醋酸钠缓冲液，pH3.80~5.72；MES 缓冲液，pH5.18~7.10；Tris-HCl 缓冲液，pH7.0~9.0。用以上缓冲液替代标准酶活力测定中的 pH4.6 醋酸-醋酸钠缓冲液，测定酶活力以最大值为 100%。

pH 值稳定性的测定：将酶液与前述不同 pH 值（3.5~7.5）的缓冲液混合后，保温不同时间后立即冷水冷却，然后按标准方法测定木聚糖酶的剩余酶活力（用未经处理的酶液作对照）。

2.2.4.2 最适温度和热稳定性

最适温度：在 pH4.6 的醋酸-醋酸钠缓冲体系中，反应时间 30min 的条件下，在不同温度下（30~80℃）测定木聚糖酶活力，以最大值为 100%。

热稳定性：酶液在 pH4.6 的醋酸-醋酸钠缓冲体系中，不同温度下（30℃~60℃）保温不同时间后立即冰水浴冷却，然后按标准方法测定木聚糖酶的剩余酶活力（用未经处理的酶液作对照）。

2.2.4.3 金属离子和螯合剂（EDTA）对酶活力的影响

根据上述标准酶活力的测定方法，进行最终浓度为 0.1mol/L 金属离子和螯合剂（EDTA）对酶活力的影响试验。不添加任何金属离子和螯合剂作为对照，以标准方法测定酶活力。金属离子包括： Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ag^{+} 、 K^{+} 、 Zn^{2+} 、 Na^{+} 、 Fe^{2+} 。

2.2.5 木聚糖发酵物中糖成分分析

黑曲霉固体发酵物，对照物为高温灭菌培养基，分别称取 8g 和 13g 加入 100mL 水，研钵研磨后过滤，溶液待测；取木寡糖产品（含量 95%）1g 溶于 100mL 水中。溶液用毛细管点样 5 μL ，展开、显色。

薄板制作：参考杨景芝，孙衍华（2003）。

显色剂：称取 5g 二苯胺，加 10mL 苯胺、50mL85%（体积分数）磷酸混合溶解后，加丙酮稀释至 500mL，即得苯胺-二苯胺-磷酸显色剂。

展开剂：冰醋酸：氯仿：95%乙醇（V：V：V）=21：23：15

用毛细管取各点样液 0.5 μ L, 在活化的硅胶板距底边 1.5cm 水平线上间隔 1cm 点样。待点样液被吹干后, 进行展开剂的上行展开。展开剂至前沿时取出, 于 110 $^{\circ}$ C 下烘干, 喷显色剂, 再于 110 $^{\circ}$ C 下烘烤 10min 显色。

2.2.6 托盘发酵工艺研究

2.2.6.1 种曲接种量对托盘发酵酶活的影响

三角瓶培养种曲, 按 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15% 比例分别接种到固体培养基质上, 置于托盘上在同条件下进行培养 40h, 培养过程中倒盘两次并打碎结团, 培养结束后采用五点取样, 混合均匀后测定不同接种量的酶活。

2.2.6.2 托盘装料量对酶活的影响

托盘 (40 \times 30 \times 4cm) 装料量按 300g, 400g, 500g, 600g 装料, 置于托盘上在相同条件下培养 40h, 培养过程中倒盘两次并打碎结团, 培养结束后采用五点取样, 混合均匀后测定不同装料量的酶活。

2.2.6.3 托盘水分对酶活的影响

(1) 料水比对托盘产酶的影响

按照料水比 1:1.2, 1:1.4, 1:1.6, 1:1.8, 分别制作培养基质, 置于托盘上在相同条件下培养 40h, 培养过程中倒盘两次并打碎结团, 培养结束后采用五点取样, 混合均匀后测定不同含水量的酶活。

(2) 不同时期补水对酶活的影响

在不同料水比的基础上进行托盘发酵的全期和不同时期补水, 全期补水采用双层纱布覆盖, 纱布一端浸入水中, 不同时期补水采用喷水方式, 使基质表面保持湿润。培养过程倒盘并打碎结团, 培养 40h 结束测定酶活。

2.2.6.4 托盘发酵产酶曲线

在前期研究基础上进行托盘发酵产酶曲线研究, 从 16h 开始每隔 4h 取样测定酶活, 绘制酶活曲线。

2.2.6.5 不同烘干温度对酶活的影响

木聚糖酶固态培养物分别在 40 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, 70 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C, 90 $^{\circ}$ C 进行烘干, 至水分 10%~14% 结束, 分别取样测定烘干前后酶活损失情况。

2.2.6.6 木聚糖酶耐热性试验

水分 10% 左右的木聚糖酶分别在 40 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, 70 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C、

90℃, 100℃烘箱中干热处理 1h, 测定处理前后酶活保存情况。

2.2.7 中试生产工艺研究

2.2.7.1 中试生产工艺流程图

在前期研究基础上, 采用种曲机结合曲架匾盘进行固态发酵试验, 种曲机为宝来利来公司自制常压容器, 可通蒸气, 带有旋转装置。工艺流程如图 3。

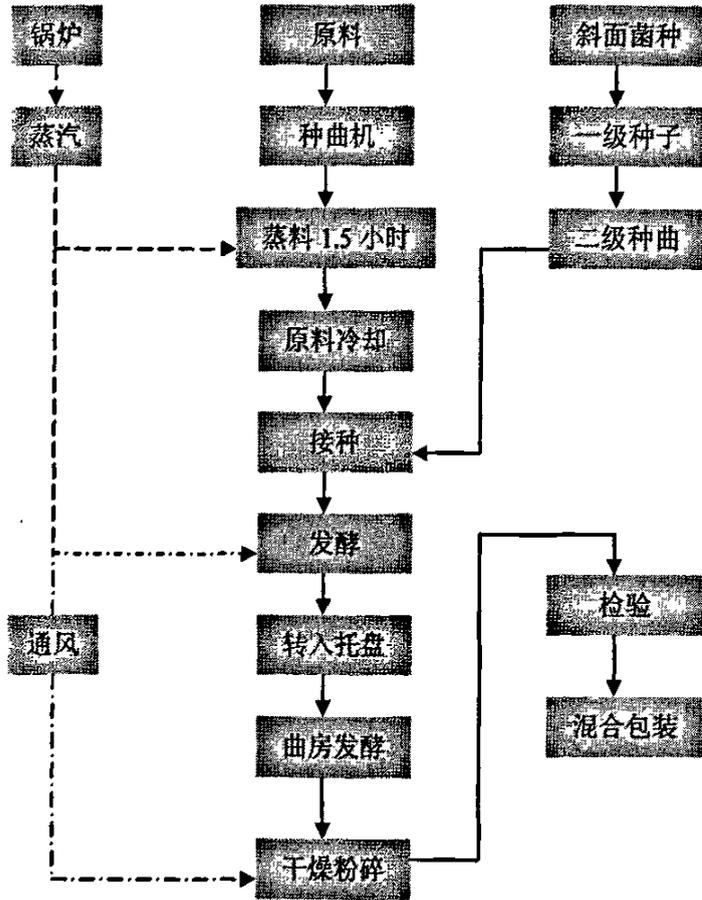


图 3 固态发酵中试生产流程图

Fig. 3 Flowchart of pilot-scale production in solid-state fermentation

2.2.7.2 配方与工艺参数

原料配方: 以麸皮和玉米芯粉 (1:1) 作为复合碳源, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2%)

和尿素（3%）作复合氮源，pH7.0，料水比 1:1.4，种曲机装料量 200kg~240kg。

原料灭菌：种曲机内通入 100℃蒸气，常压下灭菌 1.5h。

接种培养：灭菌原料冷却至 35℃，按接种量 0.5%接入孢子数 45 亿/g 的固体种曲，30℃保温通风培养，调节转速以打碎结团物料，培养 40h 结束后多点取样测定酶活。

2.2.8 饲喂动物实验

2.2.8.1 饲喂动物日粮中添加的酶

木聚糖酶样品：黑曲霉 C-2 固体发酵后制得。

商品复合酶：广东某酶制剂公司采用液体发酵方式生产单一酶后进行复配的产品，市场购买，实验室测定木聚糖酶活力 5850U/g，纤维素酶 2421U/g。

2.2.8.2 试验动物与试验设计

购买同批的杜×长×大三元杂保育出栏小猪 20 头，根据体重及性别比例相近的原则，将小猪分为 A、B、C 三个组：A 组为对照组，4 头，不设重复；B、C 组为试验组，各设 2 个重复，每个重复 4 头；A 组饲喂常规玉米-豆粕型日粮，不添加任何酶制剂，B 组在 A 组基础日粮的基础上按 0.1%添加木聚糖酶样品，C 组在 A 组基础日粮的基础上添加 0.1% 商品复合酶。试验猪处理及分组情况详见表 3。

表 3 试验猪分组处理情况

Table 3 Groups of pigs in experiment

	A	B	C
重复数（个）	1	2	2
试验猪数（头）	4	8	8
添加木聚糖酶样品	—	0.1%	—
添加商品复合酶	—	—	0.1%

2.2.8.3 试验场

宝来利来动物试验场。

2.2.8.4 试验时间

试验期从2006年8月23日至2006年9月29日，共37天，其中预试期7天，正试期30天。

2.2.8.5 试验饲料

预混料：自行设计，在宝来利来饲料公司生产，各组所用预混料均相同。

基础日粮配方及营养水平（见表4）：试验日粮均经80℃~90℃高温制粒，各试验组日粮指标检验见表5。

表4 试验猪日粮配方（%）

Table 4 Meal diet content of pigs in experiment(%)

日粮组成	A	B	C	营养水平	
玉米	63.0	63.0	63.0	消化能 (Mcal/kg)	3.10
豆粕	27.0	27.0	27.0	粗蛋白	17.90
麸皮	6.0	6.0	6.0	钙	0.50
预混料	4.0	3.9	3.9	磷	0.40
木聚糖酶样品	—	0.1	—	有效磷	0.36
商品复合酶	—	—	0.1	赖氨酸	0.88
合计	100	100	100	蛋氨酸+胱氨酸	0.57

表5 实验室化验指标

Table 5 Nutrition component analysis

项目	A	B	C
粗蛋白 (%)	17.50	17.62	16.96
钙 (%)	0.96	0.97	0.98
磷 (%)	0.53	0.52	0.50
木聚糖酶活 (U/g)	—	2677	1929

2.2.8.6 饲养管理

a、人工投料、自由采食、自由饮水，按常规进行免疫接种和驱虫；专人管理，各组均给予相同的饲养管理和环境条件。

b、每天记录各重复组投料量，并称该组余料量。观察记录每天试验猪采

食、粪便及活动情况。

c、测试指标及测定方法

增重和日增重：试验开始和结束时，以头为单位对试验猪进行全群称重，称重前 6h 停食。

腹泻率：每天记录各组腹泻猪头数，统计试验期间各组腹泻率。

每天统计耗料：试验结束时应回收剩料称重，耗料量=投料量-剩料量。以重复组为单位，计算其平均体重、增重、日增重、料肉比等指标。

d、综合经济效益分析：以增重、饲料成本为指标，进行经济效益分析。

3 结果与分析

3.1 固体发酵培养基和发酵条件的优化

高效生产木聚糖酶的关键因素是选择合适的诱导底物和最适的培养基组成，因此，为了深入了解菌株在固体发酵条件下的产酶情况，本研究针对影响菌株生长和木聚糖酶合成的因素，包括碳源、氮源、料水比、培养温度等发酵条件进行了探讨。

3.1.1 发酵培养基的优化

3.1.1.1 碳源的优化

由于木聚糖酶是诱导酶，在微生物的产酶过程中，碳源不仅充当着微生物生长代谢的能量，而且也是木聚糖酶合成和分泌至关重要的诱导物。因此，碳源的种类和性质直接影响微生物木聚糖酶的分泌和产量。

表 6 碳源对菌株产酶的影响

Table 6 Effect of carbon sources on xylanase production

碳源 Carbon source	生长情况	木聚糖酶活力 (U/g) Xylanase activity
麸皮	+++	1717
玉米芯粉	++	696
甘蔗渣	+	306
啤酒糟	+	335

注：+：一般；++：好；+++：较好

采用麸皮、玉米芯粉、甘蔗渣、啤酒糟作为单一碳源进行菌株的产酶试验，结果表明（表 6），麸皮作为单一碳源菌株产酶量显著高于其它碳源，其次是玉米芯粉，而其它几种碳源，即甘蔗渣和啤酒糟作菌株产酶的单一碳源时，活力水平与麸皮相比都较低。在实验过程中，通过观察固体培养基发现，麸皮作单一碳源时，发酵 26h 左右即能在培养基的固体颗粒表面观察到白色的菌丝体，随着发酵时间的增加，白色菌丝体也随之增多，到 40h 左右，白色菌丝体消失并产生黑色孢子。而其它的碳源或者难以观察到菌丝体，或者观察到的菌丝体较为稀疏，这就表明菌株在麸皮培养基

上生长情况较好。

由于麸皮的成本相对于其它的几种碳源原料稍高一些,为降低酶制剂工业的生产成本,考虑在单一的麸皮碳源中添加其它成分,进行复合碳源的发酵。表7是添加等量的其它碳源进行复合碳源的试验结果。

表7 复合碳源对菌株产酶的影响

Table 7 Effect of complex carbon sources on xylanase production

复合碳源组分比 Carbon source	木聚糖酶活力 (U/g) Xylanase activity
麸皮: 玉米芯 (1:1)	2911
麸皮: 甘蔗渣 (1:1)	2531
麸皮: 啤酒糟 (1:1)	2837

本试验采用麸皮和玉米芯作复合碳源进行发酵实验,表8是添加不同含量的玉米芯粉进行复合碳源试验的结果。以适当比例添加玉米芯粉有利于菌株的产酶:当复合碳源(麸皮:玉米芯粉)组分为8:2时,其产酶量与单一的麸皮碳源相当,当组分比调整至5:5时,酶活力产生较大增幅,增幅为菌株以麸皮作为单一碳源时产酶量的69%;继续增加玉米芯粉的量不能使产酶量增加。原因可能在于:在麸皮培养基中适量添加玉米芯粉,改善了固体培养基质的通气及散热条件,较利于菌株的生长和木聚糖酶的合成,但当玉米芯粉的量增加而麸皮的量减少时,麸皮中所含有的宜于菌株利用的生长因子的量随之减少,从而导致菌株产酶量大幅降低。

表8 复合碳源组分比对菌株产酶的影响

Table 8 Effect of ratio of complex carbon sources on xylanase production

复合碳源 (麸皮:玉米芯粉) 组分比 Carbon source	木聚糖酶活力 (U/g) Xylanase activity
8:2	1216
6:4	1995
5:5	2902
4:6	1232
2:8	1104

3.1.1.2 氮源对菌株产酶的影响

木聚糖的合成同时受酶诱导物和酶蛋白质前体的调控，酶诱导物主要是可利用的碳源，而酶蛋白质的前体主要来自于氮源，因此氮源和碳源一样，其类型和性质都会影响酶的合成和分泌。以复合碳源（麸皮:玉米芯粉）1:1 作培养基，分别添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、尿素、 NaNO_3 、蛋白胨、棉粕、酵母膏等无机和有机氮源（添加量均为培养基干料的 1%）进行试验，结果如表 9 所示。从实验结果来看，总体上，有机氮源比无机氮源利于菌株合成和分泌木聚糖酶，此结果与 Hop (Hop, 1995) 等的研究结论相一致。但蔡敬民 (1997) 报道，无机氮对菌株的产酶也有较大的提高。

表 9 氮源对菌株产酶的影响

Table 9 Effect of nitrogen sources on xylanase production

氮源 Nitrogen source	木聚糖酶活力 (U/g) Xylanase activity
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3431
NaNO_3	3017
尿素	3314
蛋白胨	3552
酵母膏	3447

选取几种氮源按照 1:1 的比例作为复合氮源（添加量均为培养基干料的 1%），来考查其对菌株产酶的影响。结果（表 10）表明， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和尿素作为复合氮源时，对木聚糖酶的合成有更大的促进作用，最高酶活力增加了 50%左右。在发酵过程中观察培养基的变化，在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和尿素复合氮源培养基的表面，相比其它几种复合氮源，菌丝体更为茂密，并且发酵后期所产生孢子体的量也较多。

表 10 复合氮源对菌株产酶的影响

Table 10 Effect of complex nitrogen sources on xylanase production

氮源	木聚糖酶活力 (U/g)
Nitrogen source	Xylanase activity
(NH ₄) ₂ SO ₄ /尿素	4920
(NH ₄) ₂ SO ₄ /NaNO ₃	4614
蛋白胨/酵母膏	4512
蛋白胨/尿素	4085

以复合碳源（麸皮：玉米芯粉）1:1 作培养基，以(NH₄)₂SO₄ 和尿素作为复合氮源，对(NH₄)₂SO₄ 和尿素的添加量进行二因素，三水平的正交实验，以获得最佳配比。试验安排和试验结果如表 11 所示。

从研究结果（表 12）可看出，在适宜的碳氮源条件下，菌株的木聚糖酶产量增幅很大，说明菌株采用固体发酵方法产酶能力相当强。Leathers (1986) 等发现在液体发酵过程中，影响菌株酶产量的因素是代谢产物的抑制，也就是说培养基中还原糖的积累对菌株合成和分泌木聚糖酶有抑制作用；Daniela (2001) 等的研究表明，在以麸皮作为曲霉菌 (*Aspergillus tamaritii*) 固体发酵的诱导物时，能够消除菌株合成木聚糖酶的产物抑制，其原因可能是多种因素的协同作用，包括在固体培养基中较低的水分活度使得其中的各组分的扩散速度变缓，扩散强度变弱，从而消除了产物抑制作用。

表 11 因素水平设置表

Table 11 Factors and level set

水平/因素	A (NH ₄) ₂ SO ₄	B 尿素
1	2.0%	2.0%
2	3.0%	3.0%
3	4.0%	4.0%

表 12 正交结果分析

Table 12 The results of orthogonal test

序号	A	B	木聚糖酶活力 U/g
1	1	1	8904
2	2	2	7267
3	3	3	8490
4	1	2	9242
5	2	3	7524
6	3	1	6975
7	1	3	7639
8	2	1	7435
9	3	2	7721
m1	8595	7771	Σ=71197
m2	7409	8077	
m3	7729	7884	
R	1186	306	A ₁ B ₂

3.1.1.3 KH₂PO₄对菌株产酶的影响

在培养基中添加不同浓度的 KH₂PO₄，其它条件不变，进行产酶试验，结果如图 5 所示。

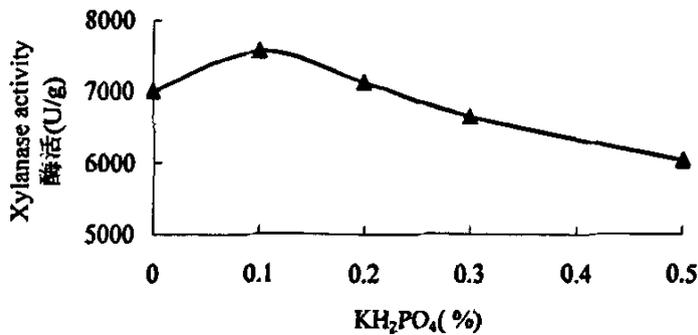


图 5 KH₂PO₄对产酶的影响

Fig. 5 Effect of KH₂PO₄ on the production of xylanase

试验结果(图5)表明:0.1% KH_2PO_4 为最适添加量,大于0.3%后对产酶产生抑制作用,这可能与高浓度的磷酸盐对菌体的生长有抑制作用有关(熊宗贵,1995)。

3.1.1.4 添加 TW-80 对菌株产酶影响

TW-80 是常用在发酵基质中的表面活性剂,研究认为,它可以强化基质的传质传氧,提高细胞膜的通透性,使酶易于向胞外分泌,在培养基中添加0.1%~0.5%的 TW-80 进行发酵试验,结果(图6)表明,添加0.3%左右的 TW-80 能提高酶的产量。

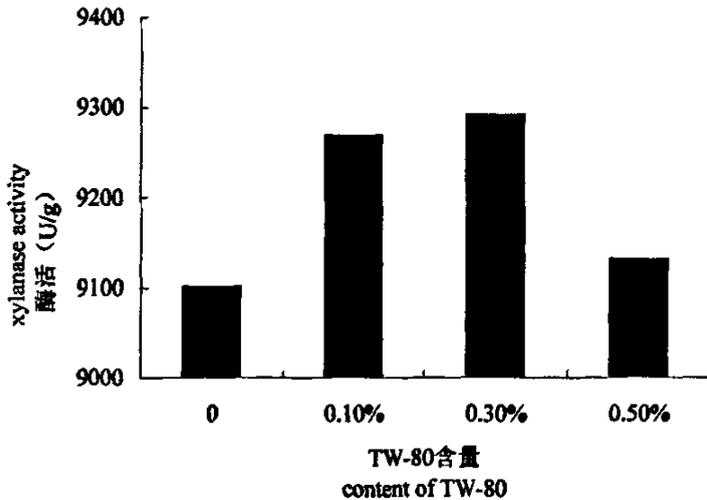


图6 TW-80 对菌株产酶的影响

Fig. 6 Effect of TW-80 on xylanase production

3.1.1.5 培养基料水比对菌株产酶的影响

在固体发酵过程中,培养基的初始水分含量是影响菌株产酶的关键因素之一。在优化了碳氮源的基础上,考查培养基的料水比对菌株产酶的影响,结果如图7所示。结果表明,培养基料水比对菌株产酶有较大影响:当料水比为1:1.4~1:1.8时,产酶量变化不明显,但是料水比1:1.4时,生长情况较好,菌丝体生长均匀。继续增大料水比,产酶降低。含水量过低,导致孢子萌发延长,影响菌丝体的生长周期,产酶量降低;含水量过高,会造成培养基内溶氧不足,发酵不彻底,培养基利用率下降,从而影响酶

的产量。

Gessesse (1999) 等在对一株细菌 *Bacillus sp.* A-009 进行固体发酵培养时, 得到的结论是当料水比为 1:1 获得了最大的木聚糖酶产量。而 Beg (2000) 等用麸皮作为碳源研究链霉菌 *Streptomyces sp.* QG-11-3 的固体发酵时, 得到最佳产酶的料水比为 1:3。尽管 Roussos (1991) 等提出在真菌的固体发酵中, 较高的湿度利于提高酶的产量, Kalogeris (1998) 等在对真菌 *Thermoascus aurantiacus* 的研究中也得到了相同的结论(料水比为 1:4 和 1:5 时酶产量最大), 但可能由于不同菌株生长和产酶特性的不同, 作为影响其生长关键因素的料水比也会相应的产生变化。

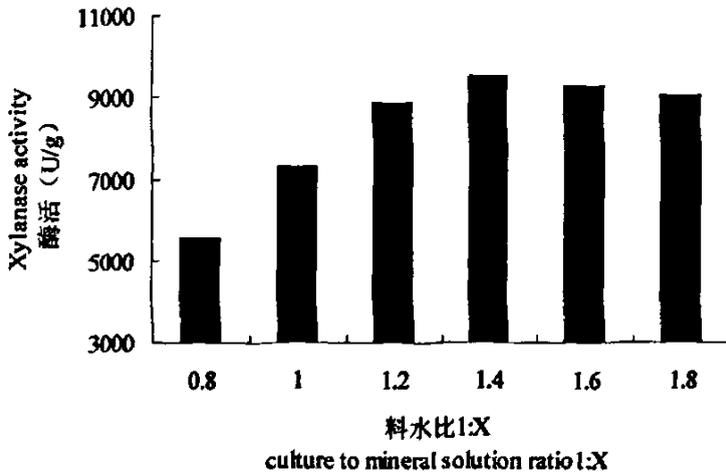


图 7 培养基料水比对菌株产酶的影响

Fig. 7 Effect of carbon source to mineral solution ratio on xylanase production

3.1.1.6 培养基初始 pH 值对菌株产酶的影响

将固态产酶培养基的初始 pH 调至不同进行发酵试验, 试验结果如图 8 所示。试验结果表明, 当培养基初始 pH7.0 时, 菌株产酶量最高; 当培养基初始 pH4.0 时, 菌株产酶量为 pH7.0 时的 94.9%; 当培养基初始 pH 增至 6.0 时, 菌株产酶量有小幅增加, 为 pH7.0 时的 97.5%。培养基的初始 pH 值继续升高至偏碱性时, 菌株的产酶量不再增加, 出现明显下降: 培养基初始 pH8.0 的产酶量是 pH7.0 的 74.9%。当培养基的初始 pH 值升

至碱性时, 菌株的产酶量大幅下降: 培养基初始 pH10.0 酶产量与 pH7.0 相比下降了 30.8%。此结果说明在中性偏酸的培养基条件下更利于菌株合成和分泌木聚糖酶。

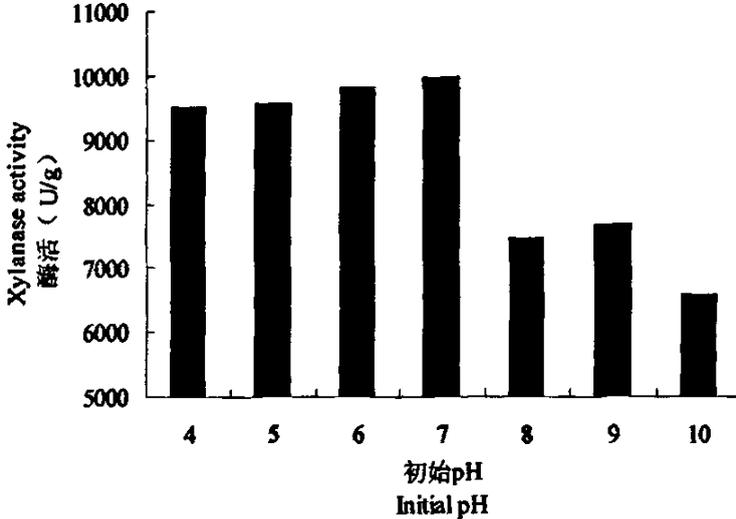


图 8 培养基初始 pH 值对菌株产酶的影响

Fig. 8 Effect of initial culture pH value on xylanase production

分析以上结果, 可以认为培养基的初始 pH 值主要是通过影响菌株的生长从而最终影响到菌株合成和分泌木聚糖酶。由于只有在适宜的培养基条件下, 孢子体正常萌发, 菌丝体正常生长, 菌株才能够大量合成和分泌木聚糖酶, 否则菌丝体的生长繁殖受到影响, 从而导致酶产量的下降。在发酵过程中通过观察培养基的变化情况, 也能够大致分析菌株的生长状态。在中性偏酸的培养基颗粒表面, 白色绒毛状的菌丝体出现时间相比偏碱性的培养基早, 且更为茂密, 另外在发酵后期产生的黑色孢子体的量也较多。

3.1.2 发酵条件的优化

3.1.2.1 装料量对酶活的影响

关于单位空间载曲量的研究少有报道, 其原因是该参数受干扰的因素太多, 但其关键控制点还是料曲的温度 (王春林, 2004)。根据生产实践

和已有的研究表明,影响该参数的因素主要有:菌种的生长代谢性能(主要是产热性能)、空气温度和相对湿度、料曲的透气性。

将不同重量的料曲装入 500mL 三角瓶中,接种后在同一条件下培养,测定装料量(以干基计算)和发酵酶活的关系。由图 11 可以看出,装料量在 20g 时,酶活力达到最高,随着装料量的加大,酶活迅速降低。

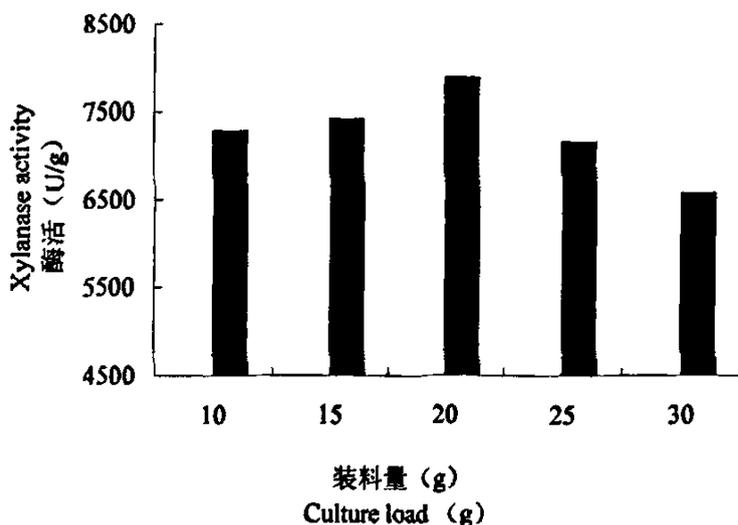


图 9 装料量对产酶的影响

Fig. 9 Effect of culture load on xylanase production

实验结果说明:适当的装料量对酶活的提高有一定的作用。装料量太多,培养基内空气的流通性差,从而影响菌丝体的生长,导致产酶的下降。

3.1.2.2 接种量对菌株产酶的影响

在优化碳源和氮源的基础上,采用不同的接种量接种,来考察接种量对菌株产酶的影响。孢子悬液的孢子数为 10^9 cfu/mL,通过在每瓶发酵培养基中接种不同体积的孢子悬液来进行产酶试验,结果如图 10 所示。实验结果显示,采用 2.0mL 孢子悬液 (10^9 cfu/mL) 接种较为适合菌株木聚糖酶的生产。接种量过低,则菌丝体生物量增长缓慢,产酶周期延长;接种量过高,则菌株生长过快而不利于木聚糖酶的合成,导致产酶量降低。

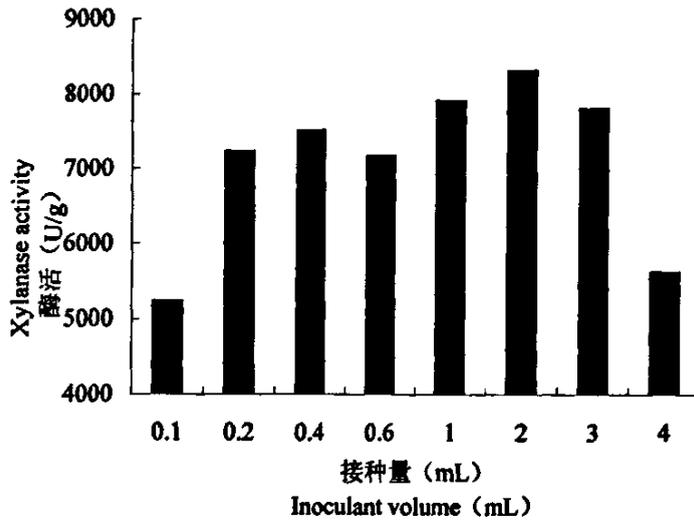


图 10 接种量对菌株产酶的影响

Fig. 10 Effect of inoculum level on xylanase production

3.1.2.3 培养温度对菌株产酶的影响

在优化碳源和氮源的基础上，调节培养基的初始 pH 值至最适，采用不同温度对菌株进行发酵培养，结果如图 9 所示。由图 9 可知，本实验条件下，在 30℃ 时菌株木聚糖酶的产量达到最高。另外该菌在 35℃ 发酵也能得到较高的酶活力，而在 20℃ 和 45℃ 条件下培养该菌株仅能得到最高酶活力的 44.7% 和 67.1%。培养温度过高和过低，均会影响孢子的萌发和菌株的生长。培养温度过低，则菌株生长缓慢，发酵周期延长，因而产酶量低；培养温度过高，菌株生长速度加快，菌丝体容易老化，孢子体较快形成，不利于木聚糖酶的合成与分泌，则木聚糖酶产量下降。

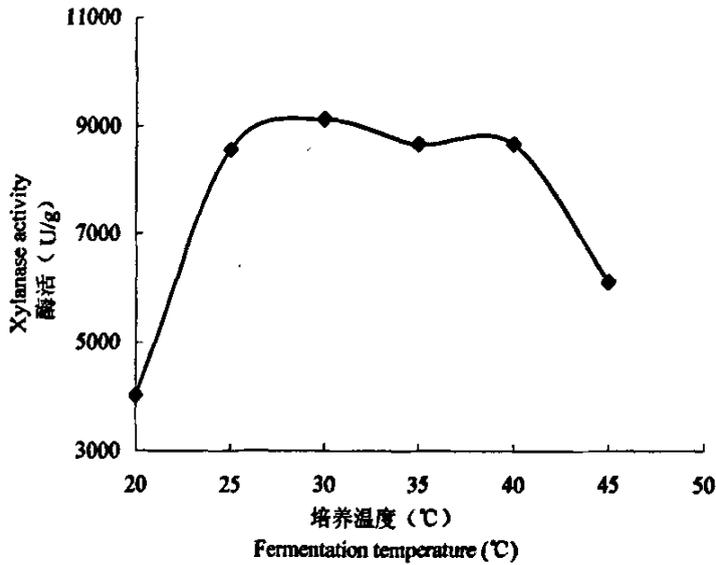


图 11 培养温度对菌株产酶的影响

Fig. 11 The effect of temperature on xylanase production

3.1.2.4 产酶曲线

图 12 是菌株在固体发酵培养条件下的产酶曲线。菌株在优化的发酵条件下，发酵 24h 能检测到少量的木聚糖酶，30h 后酶量开始明显增加，发酵 42h 产酶量达到最高：木聚糖酶活力高达 10068U/g，然后酶活力逐渐下降。因此在木聚糖酶的实际生产中，应根据菌株产酶进程中的这种规律，控制好结束发酵收获酶制剂的最佳时机，在酶产量已达到最高还未开始下降时结束发酵，提取酶液。从产酶曲线可以看出，发酵各阶段菌株的木聚糖酶的合成与分泌并不均衡：发酵 24h 菌株所产的木聚糖酶仅占其总酶量的 49%，而在随后的 18h 内，菌株合成并分泌了其总酶量的 51%，说明菌株的发酵后期是产酶的高峰期。

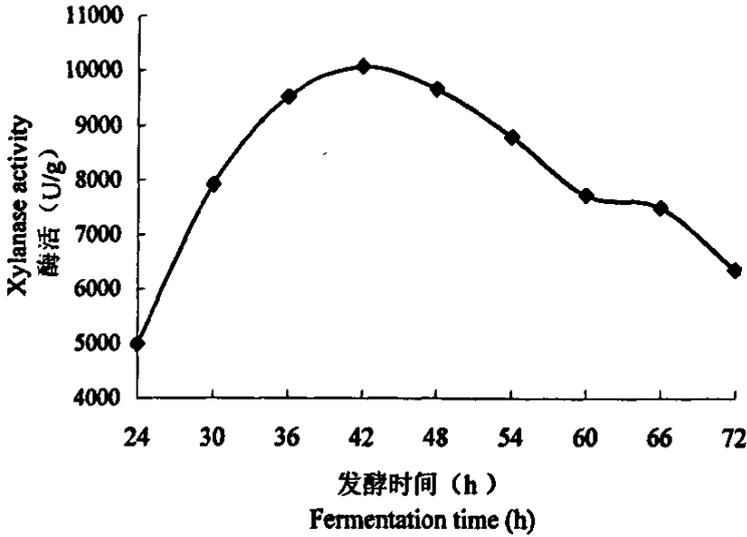


图 12 产酶曲线

Fig. 12 Time course profile in the production of xylanase

3.2 木聚糖酶的酶学性质研究

微生物产生的木聚糖酶存在着多样性：一方面，微生物常常产生不止一种类型的木聚糖酶，另一方面，其木聚糖酶的特性也存在差异。根据木聚糖酶催化区的氨基酸的同源性和催化特性，木聚糖酶大致可分为 F/10 和 G/11 (Bernard, 1991)。不同族的木聚糖酶性质明显不同，即使同一族的木聚糖酶，尽管它们的催化区域具有较高的同源性，但由于其来源的不同，其最适反应条件、各种化学物质对酶活力的影响也不尽相同。木聚糖酶的多样性决定了了解其性质的重要性。

本研究主要讨论了固体发酵后的木聚糖酶的最适 pH 值和 pH 稳定性、最适温度和温度稳定性、以及一些化学物质对酶活力的影响。

3.2.1 最适 pH 值和 pH 稳定性

反应体系的 pH 值对酶反应的影响是多方面的。pH 值通过影响酶蛋白的构象以及酶与底物的荷点性质，从而影响酶的活性部位与底物的接近和结合。酶分子要表现出活性，其活性部位的有关基团都必须选取一定的解离状态，其中任何一种基团的解离状态发生变化将使酶从活性状态转入

非活性状态；反之亦然。因此，作为一种两性电解质，酶在不同的 pH 值条件下其分子的活性基团会以不同的解离状态存在，通常只有一种解离状态最适合酶促反应的进行。此外，pH 值还会影响酶的稳定性，极端的 pH 值条件还会引起酶的不可逆变性。

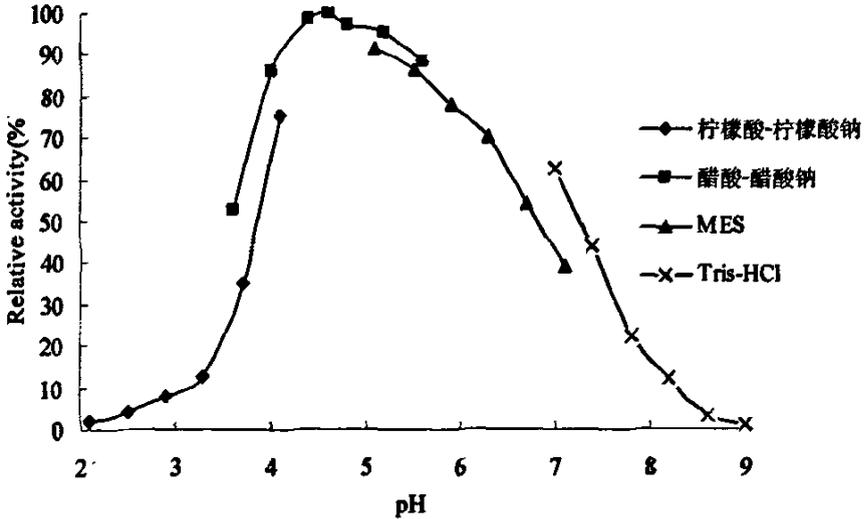


图 13 pH 值对酶活力的影响

Fig. 13 Effect of pH value on xylanase activity

考虑到缓冲溶液的缓冲能力及对酶蛋白的影响，在试验中采用不同 pH 值的缓冲溶液来配制反应体系，在 50℃ 条件下用常规方法测定酶的相对活力。不同 pH 值对酶活力的影响如图 13 所示。结果表明在不同 pH 值的缓冲液条件下，该酶的活力变化较大：其最适反应 pH 值为 4.4~4.8。

在 30℃ 条件下酶的 pH 稳定性如图 14 所示。酶在试验采用的 pH4.5~7.5 范围内、处理不同时间（1h~6h）的条件下表现出了优良的稳定性，由此说明，该酶具有较强的耐酸性能，非常适合应用于饲料工业。

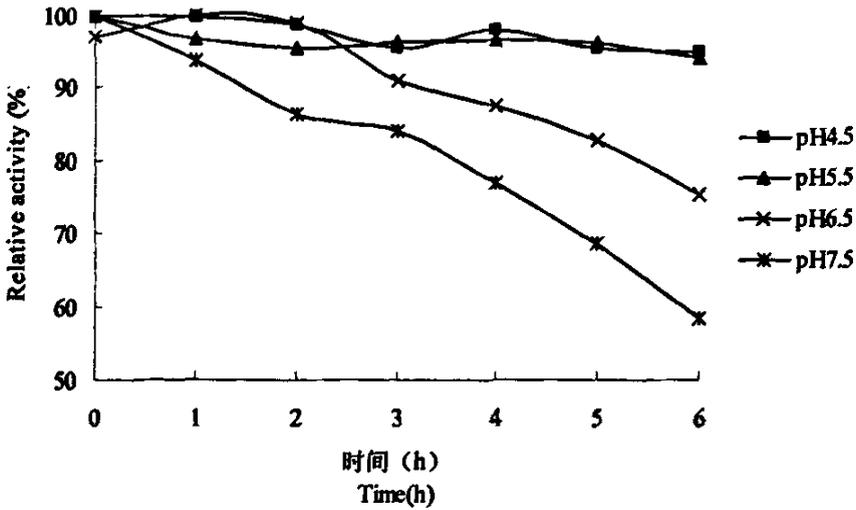


图 14 pH 值对酶稳定性的影响

Fig. 14 Effect of pH value on the stability of xylanase

3.2.2 最适温度和热稳定性

温度对木聚糖酶的影响同样是多方面的，在较低的温度范围内，酶的活力随温度的升高而提高。随着温度的进一步提高，酶蛋白的构象及参与酶促反应的功能基团的解离状态、酶与底物的亲和力等都将改变，酶分子所表现出的活性就发生变化。在更高温度条件下酶蛋白的构象会发生重大变化而发生热变性，即酶蛋白将丧失活性。温度既能改变酶反应本身的速度，也能导致酶蛋白变性失活：即酶催化反应速度和酶失活的速度随温度的升高而同时提高。由于任何一种反应都是在一定温度下进行的，温度的这两种效应都会发挥作用。这两种效应的综合结果，就是酶的“最适温度”。

该酶的最适反应温度如图 15 所示。在不同温度条件下测定该木聚糖酶的活力，结果显示酶反应的最适温度为 50℃。实验发现酶的活力受反应温度的影响较大：酶在 40℃时表现出 72%的酶活力；当酶的反应温度升高至 45℃和 55℃时，酶活力明显增加，活力水平为 81%和 95%；当酶的反应温度继续升高至 70℃时，酶活力下降很快，仅表现出约 34%的酶活力。

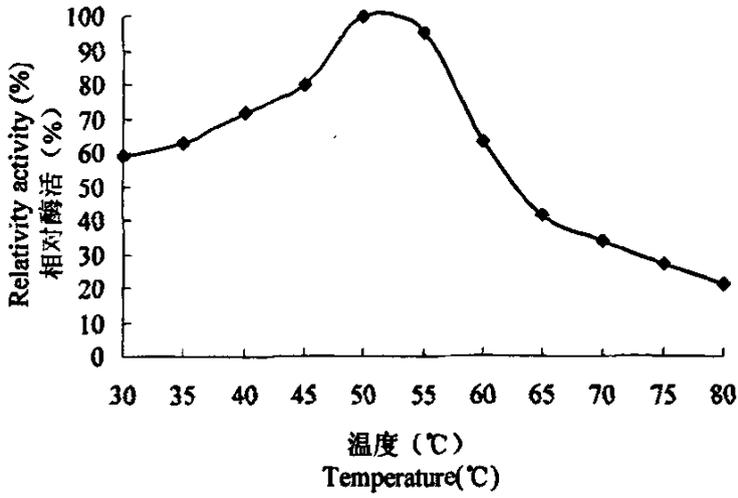


图 15 温度对酶活力的影响

Fig. 15 Effect of temperature on activity of xylanase

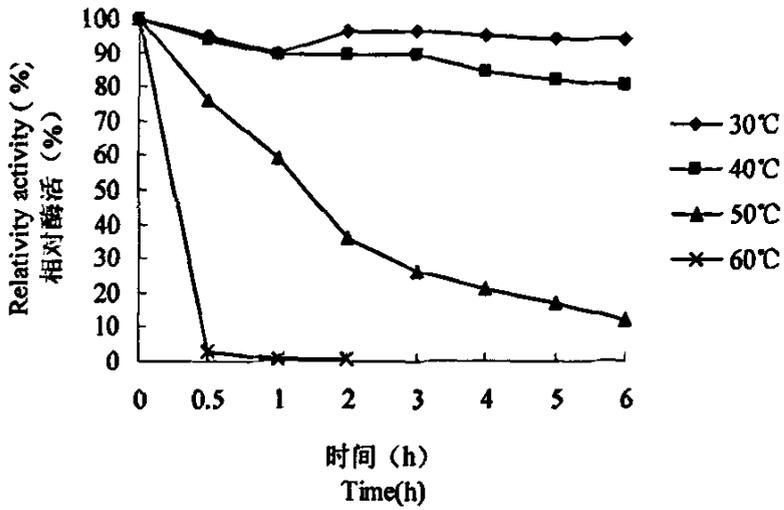


图 16 热稳定性

Fig. 16 Thermal stability of xylanase

将酶液在PH4.6的醋酸-醋酸钠缓冲体系中,不同温度下(30°C~60°C)

保温 6h 来考查该酶的温度稳定性, 结果如图 16 所示。从图 16 可以看出, 该酶在 30℃ 时相当稳定, 保温 4h 后酶活力酶活力仍有 95% 以上, 酶活力基本上未受影响; 在 40℃ 保温 4h 后残余酶活力在 89% 以上, 表明该酶在 40℃ 条件下也较为稳定。

3.2.3 金属离子和螯合剂 (EDTA) 对酶活力的影响

在最终浓度为 1mmol/L 的金属离子和 EDTA 存在于反应体系中的情况下, 酶活力的变化情况见图 17, 试验中采用的大多数金属离子都对酶活力有一定的影响, 但影响程度都不大, 此结果与筱丹丹对木聚糖酶粗酶性质的研究结果一致 (筱丹丹, 2004)。金属阳离子螯合剂 EDTA 和 Zn^{2+} 对酶活力几乎没有什么影响。其中, Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Na^{+} 三种金属阳离子对酶反应有促进作用, 可分别提高酶相对酶活力至对照的 109%、115% 和 119%; Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Ag^{+} 、 K^{+} 和 Fe^{2+} , 这几种金属阳离子对酶反应有抑制作用, 可分别抑制酶的相对酶活力至对照的 87%、92%、56%、90%、93% 和 88%。在对酶活力有抑制作用的金属阳离子中, Mn^{2+} 对酶反应所产生的抑制作用最强烈: 近一半的酶活力丧失, 其原因可能是该金属离子影响了酶蛋白分子中的-SH, 从而改变了酶分子的构象及活性部位, 导致酶活性的丧失。酶蛋白的稳定性除了受蛋白本身性质的影响之外, 酶溶液中可溶性蛋白的种类与含量都有可能影响其稳定性。因此, 同一株菌所产的木聚糖酶的稳定性由于研究者的不同而得出不同的结果 (Lischnig T, 1993; Gomes J, 1993)。

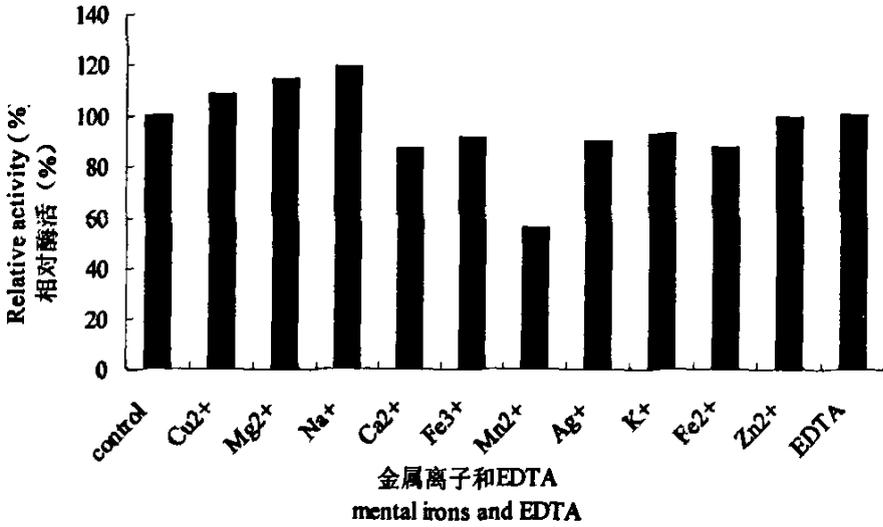


图 17 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响

Fig. 17 Effect of mental ions and EDTA on xylanase activity

3.2.4 木聚糖酶发酵物抽提液中的寡糖组分

发酵物 1 和发酵物 2 为黑曲霉固体发酵物,对照物为高温灭菌培养基,分别称取 8g 和 13g 加入 100mL 水,研钵研磨后过滤,溶液待测;取木寡糖产品(含量 95%) 1g 溶于 100mL 水中。溶液用毛细管点样 5 μ L,展开、显色(图 18)。结果发现发酵产物中木寡糖含量较高,组分与木寡糖产品相似,可以预见发酵产物可能具有木寡糖的益生作用。每个样品的木寡糖组成并不一致,可能是由于木聚糖酶系中酶的组成差异导致的结果。

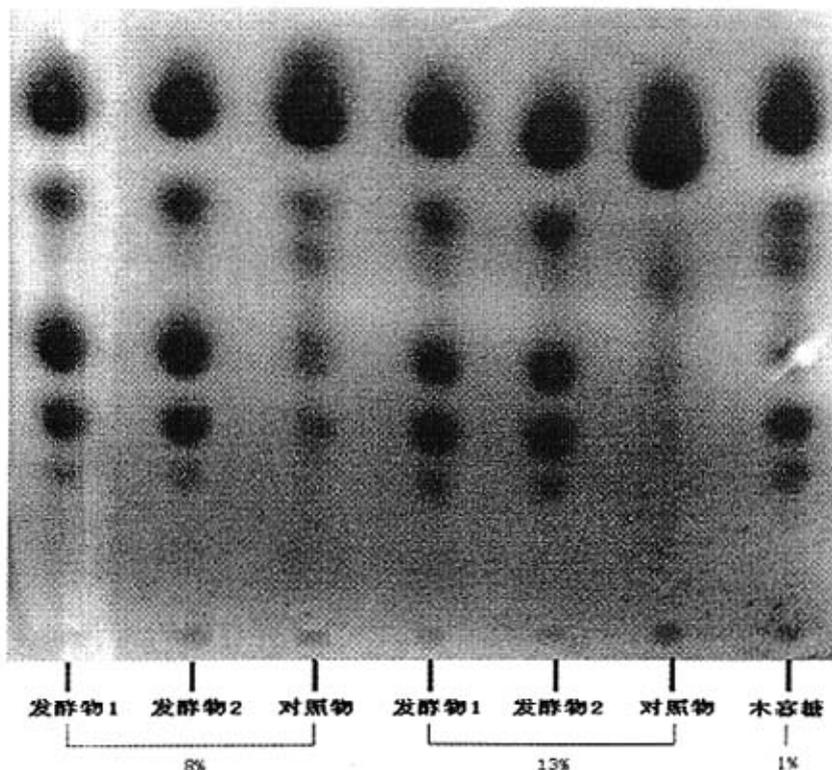


图 18 木聚糖酶发酵物抽提液寡糖组分

Fig. 18 Oligoxylose in centrifugation liquid of xylanase culture

3.3 托盘发酵工艺研究

3.3.1 种曲接种量对托盘发酵酶活的影响

三角瓶固体种子经血球计数板计数孢子数为 30 亿~50 亿，在不同接种量情况下的酶活变化见图 19。可以看出在接种量 0.25%酶活最低，与其他组呈现较大差别，实验观察也发现菌丝生长较慢，0.5%~0.75%即可以达到较高酶活，而 1%以上的接种量对提高酶活没有显著的影响，因此固体种子接种量以 0.5%~0.75%为宜，而且可以节约种曲用量。

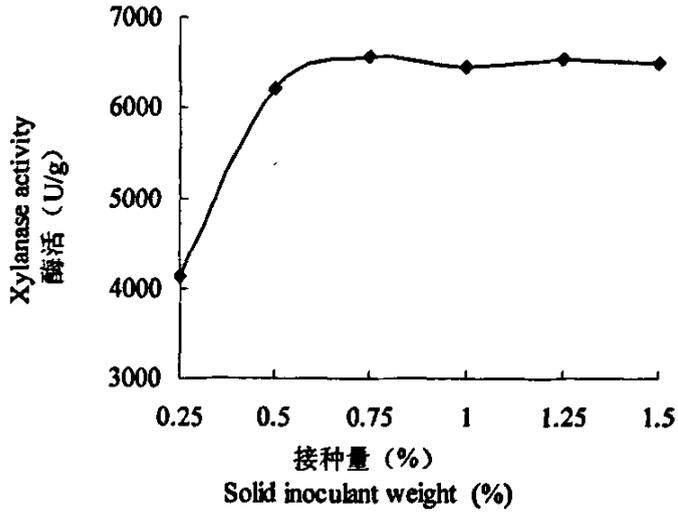


图 19 不同固态种子接种量对产酶的影响

Fig.19 Effect of solid inoculant weight on xylanase production

3.3.2 托盘装料量对酶活的影响

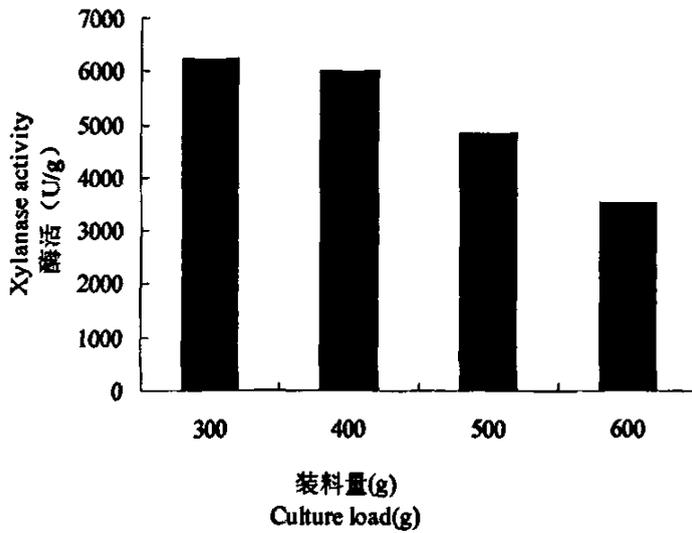


图 20 不同装料量对酶的影响

Fig. 20 Effect of culture load on xylanase production

不同装料量会影响发酵料的透气性,进而会影响菌丝生长,过高的装料量会导致菌丝生长受阻,酶活下降,装料量对酶活的影响见图 20。从图中可以看出每个托盘装料 300g 或 400g,厚度约 3cm~4cm,通气性较好,酶活达到 6300U/g 以上,相比而言装料 500g 和 600g 酶活都低于 5000U/g,装料量的多少呈现出了较大差别,而且在 600g 装料量托盘进行倒盘时发现基质内部菌丝生长受阻现象。

3.3.3 托盘发酵水分对菌株产酶的影响

3.3.3.1 料水比对托盘产酶的影响

不同料水比对托盘发酵木聚糖酶有显著的影响,见图 21。从图中可以看出料水比 1:1.6 和 1:1.8 都出现了较高酶活,与三角瓶最适料水比 1:1.4 相比有差异,其原因是在发酵过程中物料由于开放和受热导致水分散失,从而出现了与三角瓶不一致的结果。

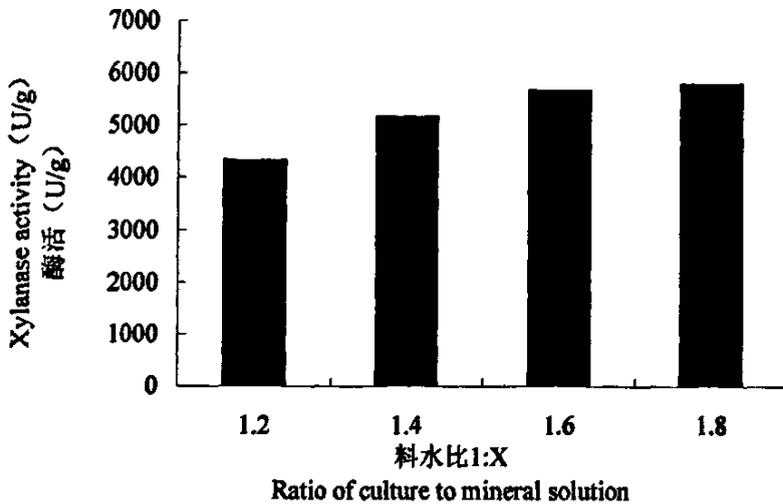


图 21 不同料水比对酶活的影响

Fig. 21 Effect of culture to mineral solution ratio on xylanase production

3.3.3.2 不同时期补水对酶活的影响

托盘开放式培养容易导致水分散失,从而影响酶活,因此采用补水方式进行弥补:一种方式是料层双层纱布覆盖,一端浸入水中,保持物料的水分;另一种方式采用喷洒补水的方式,在发热导致水分散失时进行补水。

通过与料水比 1:1.6 对照组进行比较, 结果如表 13。

表 13 不同补水方式对发酵的影响

Table 13 Effect of water supplement on solid fermentation

项目	对照	纱布补水	喷洒补水
菌丝生长状况	+	++	++
物料干结状况	+++	+	++
酶活分析	5780U/g	6466U/g	6814U/g

从表 13 中可以看出补水方式对菌丝生长具有良好的促进作用, 纱布补水由于补水量大物料最湿润, 不易干结, 而对照组由于缺水干结较重, 喷洒补水方式菌丝生长和干结情况均适中, 而且得到了最高酶活, 是比较好的补水方式。

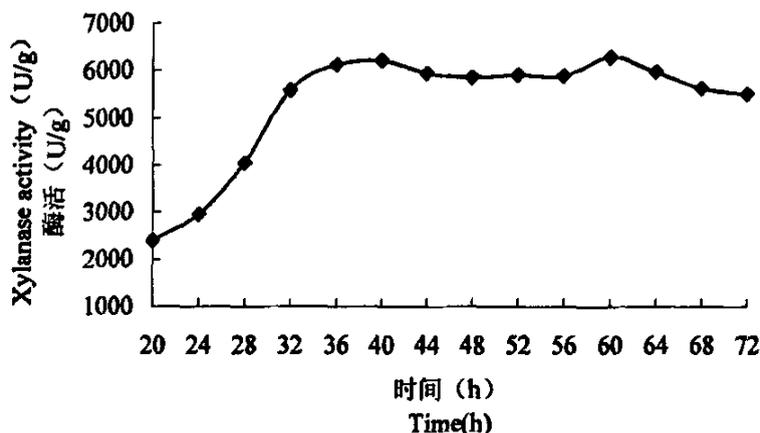


图 22 托盘发酵产酶曲线

Fig. 22 Time course profile in the production of xylanase

3.3.4 托盘发酵产酶曲线

对托盘发酵过程的产酶曲线进行试验, 每隔 4h 取样放入冰箱, 每 24h 检测所取样品酶活, 绘制曲线如图 22。

从图 22 中可以看出酶活高峰出现在 40h 左右, 继续延长发酵周期,

酶活并无明显变化。而最高酶活出现在 60h，但此时菌丝已经生出大量孢子，在物料粉碎时孢子容易飞散而污染环境，并对工作人员呼吸道有潜在的危害，因此从安全性和经济性考虑，选择 36h~40h 结束培养过程。

3.3.5 干燥温度对酶活的影响

木聚糖酶固态培养物分别在 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃ 进行烘干，烘干过程进行通风，物料水分至 10%~14% 时结束，烘干前后酶活损失情况见图 23。物料培养结束水分含量处于 40% 左右，在低温（50℃ 以下）条件下烘干约需要 3h 多，高温（80℃ 以上）条件下烘干仅需 1h，虽然高温能够缩短烘干时间，但是对酶活的损害也是非常明显的，因此综合考虑通风烘干温度应在 60℃ 左右，即可以较好的保存酶活性，也可以减少能量消耗。

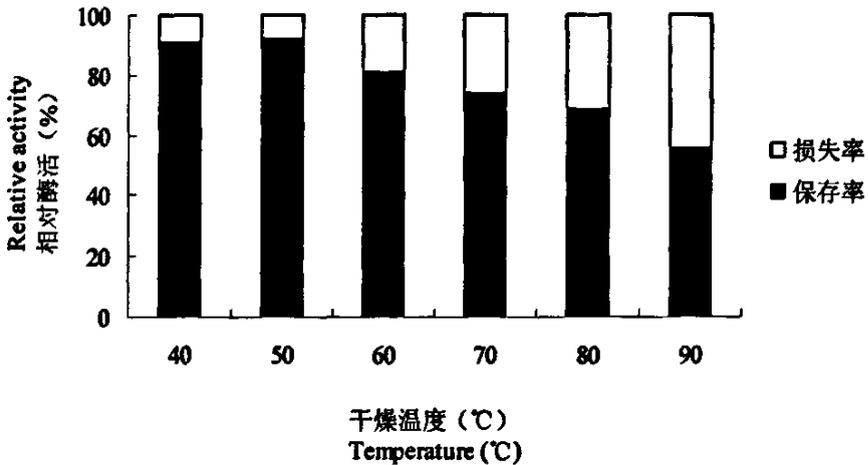


图 23 干燥温度对酶活的影响

Fig. 23 Effect of dry temperature on xylanase activity

3.3.6 木聚糖酶耐热性研究

取水分 10% 左右的木聚糖酶培养物分别置 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃ 烘箱中干热处理 1h，处理前后酶活保存情况如图 24。

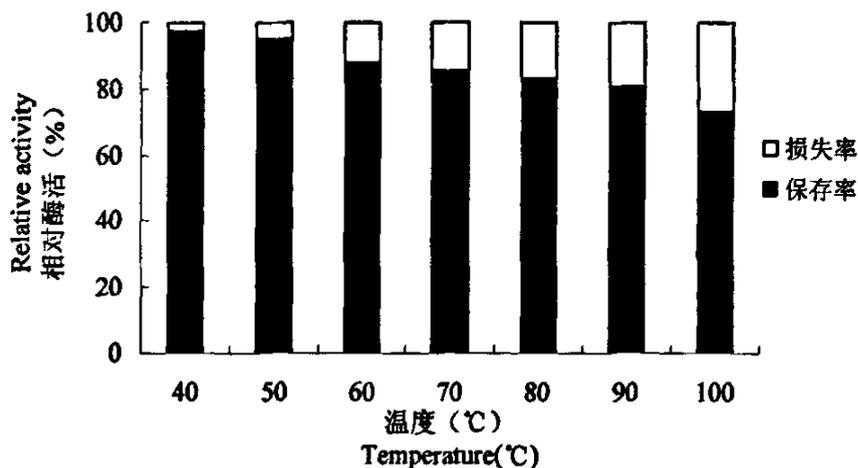


图 24 处理温度对酶活的影响

Fig. 24 Effect of diferent temperature on xylanase activity

从图 24 中可以看出固态发酵物具有良好的抗热性，即使在 100℃ 高温条件下处理 1h 保存率仍然达到 70% 以上。与干燥损失相比水分较低的物料更耐热，与湿热条件相比酶活稳定性要高很多，其原因与水分活度有关，因此即使在颗粒饲料高温制粒（80℃~90℃，10min）过程中木聚糖酶的活性损失也不大。

3.4 中试工艺研究

在前期研究基础上，采用匾盘发酵和种曲机发酵试验，原料均采用种曲机灭菌，一种方式冷却后接种并搅拌均匀后出料，转到曲房上架进行发酵。另一种方式在种曲机内发酵，种曲机从第 20h 调节最大通风量，调节转速以打碎结团物料。两种方式均发酵 40h，测定酶活。

种曲机在培养过程中发现物料菌丝生长非常不一致，而且仍然存在结团现象，部分团块内部呈现烧曲现象，检测团块内部样品木聚糖酶活低于 300U/g，菌丝生长良好的样品酶活达到 3622U/g，生长产酶效果不理想。而匾盘发酵方式则出现了菌丝生长缓慢而且大面积杂菌（主要是芽孢菌、青霉和毛霉）污染情况，经检测酶活高低不一，平均为 4234U/g。出现这种情况主要原因是原料常压灭菌不能完全杀灭芽孢和真菌孢子，而且在菌

丝生长初期温度等条件控制不好,后期水分有散失过多而导致生长不良而影响了最终的酶活力。

分析种曲机发酵结果,主要存在以下几点不足:一是种曲机转速低,物料混合存在死角,因此在菌丝快速生长时期不能有效解决结团问题;二是通风量小,在菌丝生长产热时期不能快速有效降低物料温度。以上两点是造成结团烧曲现象的根源,因此再进行第二批试验时进行了工艺改进,从第16h给予最大通风量,并于24h出曲,转入曲房匾盘,装料3kg左右,厚度5cm~8cm,在架子上进行后序发酵。另外,由于曲房不如种曲机保湿效果好,因此采用喷洒方式补水,喷水量视物料干结情况而定,培养过程进行翻曲,经过40h培养结束,此时菌丝生长已经达到最大值,而且尚未形成孢子,经检查没有出现烧曲现象,菌丝生长良好而且均匀,没有杂菌污染现象,多点取样实验室检测,最终酶活高达7461U/g。比较三批发酵试验,第三种种曲机+匾盘方式能够有效避免初期菌丝生长缓慢和杂菌污染现象,而后期转入曲房后又能解决物料降温、通风问题,从而避免了烧曲现象的发生,这种方式取得了非常好的效果,三种方式的比较见表14。

表 14 三种发酵工艺的比较

Table 14 comparison of three fermentation process

项目	匾盘	种曲机	种曲机+匾盘
菌丝生长速度	+	++	++
菌丝生物量	+	++	+++
杂菌污染	+++	+	+
烧曲现象	+	++	+
保水效果	+	+++	++
控温效果	+	+++	++
酶活力 U/g	4234	300~3622	7461

3.5 动物试验结果与分析

3.5.1 试验猪只体重和增均日增重

表 15 各试验组猪只体重及增重

Table15 Effect of xylanase addation on pigs' weight in experiment

项目	A	B	C
平均始重 (kg/头)	19.50±1.44	19.49±0.12	19.43±0.01
平均末重 (kg/头)	36.92±4.00	38.97±1.51	37.55±0.67
全期净增重 (kg/头)	17.42	19.48	18.12
平均日增重 (g/头·日)	581	650	604

表 15 是各处理组猪只体重、净增重和平均日增重。在试验初期, 各组猪只体重差异均不显著 ($P>0.05$)。试验期间 A 组、B 组、C 组日增重分别为: 581g, 650g, 604g, 添加木聚糖酶样品的试验 B 组平均日增重比对照组提高 11.88%, 添加商品复合酶的试验 C 组平均日增重比对照组提高 3.96%, 经分析各组差异均不显著 ($P>0.05$)。

3.5.2 试验猪只耗料及饲料转化率

表 16 各试验组猪只的料肉比情况

Table 16 Production performance of pigs

项目	A	B	C
平均耗料量 (kg/头)	41.43	42.18	39.92
日采食量 (kg/头·日)	1.38	1.41	1.33
料肉比	2.38	2.17	2.20

由表 16 可知, 试验期间各组耗料相差甚小; A、B、C 组料肉比分别为 2.38、2.17、2.20, 试验 B 组、试验 C 组饲料报酬均优于对照组, 但差异不显著 ($P>0.05$)。

3.5.3 试验期间小猪腹泻情况

表 17 小猪腹泻头日数及腹泻率

Table 17 The number and ratio of diarrhoea pigs

项目	A	B	C
Σ试验期腹泻头日数	9	8	12
Σ试验期饲养头日数	120	240	240
腹泻率 (%)	7.5	3.3	5.0

腹泻率=腹泻头日数与总头日数之比

由表 17 可知，试验期间腹泻率表现为对照组最多，试验 C 组其次，试验 B 组最少。

3.5.4 综合效益分析

通过表 18 可以看出，添加木聚糖酶制剂和复合酶都增加饲料成本；木聚糖酶样品试验组耗料增加，而商品复合酶组耗料呈现下降趋势；增重较对照组都有提高，其中木聚糖酶样品试验组增重提高幅度最大，为 11.8%；通过计算料肉比发现，木聚糖酶样品和商品复合酶都能降低料肉比，下降幅度分别达到 8.8%和 7.6%；综合经济效益木聚糖酶样品可以降低公斤增重成本 8.5%，商品复合酶则为 6.6%；通过综合分析，可以看出木聚糖酶制剂能够显著提高增重，降低料肉比，经济效益显著。

表 18 综合效益分析

Table 18 Analysis of overall benefits

项目	对照组	木聚糖酶制剂试验组		复合酶试验组	
	A	B	(B-A)/A	C	(C-A)/A
基础日粮成本 (元/kg)	1.789	1.789	—	1.789	—
酶制剂成本 (元/kg)	0.000	0.010	—	0.013	—
配合饲料成本 (元/kg)	1.789	1.799	0.6%	1.802	0.7%
平均耗料量 (kg/头)	41.43	42.18	1.8%	39.92	-3.6%
平均耗料成本 (元/头)	74.12	75.88	2.4%	71.94	-2.9%
平均净增重 (kg/头)	17.42	19.48	11.8%	18.12	4.0%
料肉比	2.38	2.17	-8.8%	2.20	-7.6%
平均饲料成本 (元/kg 增重)	4.25	3.89	-8.5%	3.97	-6.6%

4 讨论

4.1 发酵培养基和发酵条件的优化

麸皮作为单一碳源时菌株产酶量显著高于其它单一碳源,菌株在麸皮和玉米芯粉的复合碳源的培养基上,所产的木聚糖酶量有较大幅度的提高,很多研究者的研究结果也表明了这一点(陈红歌,2002)。无机氮源和有机氮源对于菌株合成和分泌木聚糖酶的影响没有较显著的差别,尿素(张年凤,2003)和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 也较为宜于菌株的产酶,而且也利于降低生产成本。但也有的研究结果与之相反(张建新,2003)。优化碳氮源的种类和比例对提高木聚糖酶活力有非常显著的影响。

适当水分含量的培养基不仅对菌株的生长至关重要,而且是木聚糖酶合成的关键因素。装料量过多或过少,会影响发酵培养基内部空气的流通,进而影响到孢子的萌发和菌株的生长,最终影响菌株合成和分泌木聚糖酶。培养温度过高和过低,均会影响孢子的萌发和菌株的生长,进而影响菌株合成和分泌木聚糖酶。培养基的初始pH值对木聚糖酶的合成有重要影响,它不仅影响细胞膜表面所带的电荷,从而引起细胞对营养物质吸收状况的变化,改变某些化合物分子进入细胞的状况,从而促进或抑制微生物的生长(洪枫,1999)。接种量对菌株的产酶有一定的影响。实验结果表明,采用2.0mL孢子悬液(10^9 cfu/mL)接种较为合适,接种量过高或过低均导致菌株产酶量降低。

4.2 酶活特性研究

该木聚糖酶最适反应pH值为4.4~4.8,酶的最适反应温度为 50°C ~ 55°C ,在 30°C ~ 40°C 时相当稳定,这与郭建栋(2004)、陈红歌等(2002)对黑曲霉木聚糖酶的研究结果相一致;金属阳离子和螯合剂EDTA对木聚糖酶活力的影响,不同研究者得出的结论存在着一定的差异(赵玉蓉,2005;陈红歌,2002;筱丹丹,2004;罗晓风,2005),这主要是因为所研究的木聚糖酶的来源不同。但都认为 Mn^{2+} 对酶反应有强烈的抑制作用。

发酵物含有较高含量的可溶性木寡糖,所以木聚糖酶发酵物具有低聚糖一样的益生作用。

4.3 托盘发酵研究

4.3.1 托盘小试工艺条件优化

固态种曲接种量不应低于 0.5%，培养基的装料量及堆放厚度对托盘固态发酵来说是个重要因素，关系到溶氧量、生产规模、杂菌污染等问题。试验结果表明，培养基堆积 3cm~4cm 厚度对生产木聚糖酶是最有利的，张建新等（2003）的研究结果也与此相一致。由于培养过程水分散失的缘故，托盘料水比与三角瓶比较要求更高，在此基础上进行不同的补水试验发现补水能够提高发酵产物酶活。托盘固体发酵的产酶高峰比三角瓶提前，主要是因为三角瓶透气性差，菌丝不能迅速地生长。

4.3.2 托盘发酵物干燥与耐热性

干燥温度对酶活的影响是比较明显的，干燥温度越高，对酶活的损害就越大，但干燥温度过低，干燥耗时大大延长，会带来生产耗能大量增加，不利于节约型生产。所以，60℃的烘干温度较好的平衡这两者之间的利弊。在 80℃~90℃保存 1h 酶活损失仍小于 15%，由此可见，该酶制剂对干热比对湿热有较强的耐受性，禹慧明等（2002）对木聚糖酶的特性研究结果也是如此。证明该酶能够耐受较高的温度，可以耐受饲料制粒的高温。

4.4 中试工艺研究

采用种曲机+匾盘培养方式，在种曲机内培养菌丝再转入匾盘进行后续发酵的两步发酵工艺，能够有效避免单独匾盘发酵方式容易污染、菌丝生长缓慢的缺陷，和种曲机通风降温效果差而导致的烧曲现象，采用两步发酵方式最终酶活达 7461U/g，取得了较为理想的效果。

4.5 动物饲喂试验

将木聚糖酶制剂与市场复合酶产品在小猪上进行动物试验，结果发现木聚糖酶制剂较对照组相比能够提高小猪平均增重 11.8%、降低料肉比 8.8%，降低腹泻效果明显，而且能够给养殖户带来更高的经济效益，整体效果优于市场复合酶产品。

5 结论

5.1 黑曲霉 C-2 最佳产木聚糖酶的培养基为：复合碳源麸皮+玉米芯(1:1)、复合氮源 2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +3%尿素、0.1% KH_2PO_4 、0.3% TW-80，料水比 1:1.4，初始 pH7.0；最佳培养条件为：500mL 三角瓶装料 20g，接种 2mL 孢子悬液 (10^9 cfu/mL)，30℃发酵 42h。

5.2 黑曲霉 C-2 木聚糖酶最适反应 pH 值为 4.4~4.8，在 pH4.5~7.5 范围内稳定，在 pH4.5~5.5 范围内保温 6h 仍能保持 95%以上的酶活力；该酶的最适反应温度为 50℃，粗酶液在 30℃~50℃的范围内稳定性较好，50℃以上耐热性差； Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Na^+ 对酶反应有促进作用， Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Ag^+ 、 K^+ 、 Fe^{2+} 对酶反应有不同程度的抑制作用。

5.3 黑曲霉 C-2 干燥发酵产物中木聚糖酶有较强的耐热性；发酵物抽提液中含有 5 种木寡糖组分。

5.4 托盘固态发酵时，种曲接种量 0.5%~0.75%，装料量 300g~400g，料厚 3~4cm，料水比 1:1.8，发酵过程中补水有利于提高托盘发酵产物木聚糖酶活力。

5.5 种曲机机内培养菌丝，转入匾盘发酵产酶的两步发酵工艺有利于菌丝生长与产酶，最终发酵酶活达 7461U/g。

5.6 动物饲喂试验结果显示木聚糖酶制剂较对照组相比能够提高小猪平均增重 11.8%、降低料肉比 8.8%，且明显降低小猪腹泻。

6 进一步的研究方向

6.1 研究高产木聚糖酶黑曲霉菌种的诱变和筛选，进一步提高酶活力；

6.2 研究木聚糖酶的提纯工艺，以及纯酶的酶学性质；

6.3 进一步研究培养基发酵后木寡糖的定量分析，将内切木聚糖酶应用于木寡糖生产；

6.4 开拓木聚糖酶在其它领域的应用。

参考文献

- [1] 蔡敬民, 吴克, 张洁等. 黑曲霉 A3 木聚糖酶发酵研究. 工业微生物. 1997, 27(2): 1~4
- [2] 蔡敬民, 张洁, 于宙等. 产高温耐碱性木聚糖酶芽孢杆菌发酵条件的正交试验设计. 生物学杂志. 1996, 1: 23~25
- [3] 陈红歌, 郭夏丽, 窦会娟等. 黑曲霉 M1 菌株木聚糖酶复合酶的固态发酵条件及其酶学性质研究. 食品与发酵工业. 2002, 29(29): 33~36
- [4] 陈红歌, 朱静, 梁改芹等. 酸性木聚糖酶产生菌的筛选及产酶条件. 微生物学报, 1999, 39: 89~93
- [5] 高培基, 许平. 资源环境微生物技术. 化学工业出版社. 2005, 41~60
- [6] 郭建林, 程彦伟, 李欢庆. 黑曲霉木聚糖酶性质的研究. 河南科学. 2004, 22(4): 10~13
- [7] 洪枫, 陈琳等. 培养基初始 pH 值对木聚糖酶合成的影响. 工业微生物. 1999, 29(4): 15~18
- [8] 怀文辉, 何秀萍, 郭文洁等. 微生物木聚糖酶降解酶研究进展及应用前景. 微生物学通报, 2000, 27(2): 137~139
- [9] 江正强, 李里特, 林清. 极端嗜热菌海栖热袍菌木聚糖酶 B 的克隆和表达. 应用与环境生物学报, 2002, 8(3): 280~284
- [10] 孔健. 农业微生物技术. 化学工业出版社. 2005, 91~110
- [11] 刘亚力. 饲料非营养调控物质的研究与应用. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1999, 27~49
- [12] 罗晓风, 何进等. 黑曲霉木聚糖酶性质的初步研究. 湖北农业科学. 2005, 3: 62~63
- [13] 王春林. α -半乳糖苷酶固态发酵中试技术参数研究. [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2004
- [14] 筱丹丹, 李剑芳, 郭敏辰. 宇佐美黑曲霉木聚糖酶粗酶性质研究. 江苏食品与发酵. 2004, 119(4)
- [15] 熊宗贵. 发酵工艺原理. 中国医药出版社: 北京, 1995
- [16] 杨浩萌, 姚斌, 范云六. 木聚糖酶分子结构与重要酶学性质关系的研究进展. 生物工程学报, 2005, 21(1): 6~11

- [17] 杨浩萌, 姚斌, 罗会颖, 张王照, 王亚茹, 袁铁铮, 柏映国, 伍宁丰, 范云六. 木聚糖酶 XYNB 分子中折叠股 B1 和 B2 间的疏水作用对酶热稳定性的影响. 生物工程学, 2005, 21(3): 414~419
- [18] 杨景芝, 孙衍华. 蜂蜜中糖的薄层展开剂的研究与应用. 色谱. 2003, 427~429
- [19] 杨瑞金. 酶法生产低聚木糖的研究:[博士学位论文]. 无锡: 无锡轻工大学, 1998
- [20] 禹慧明, 林勇, 徐有良等. 黑曲霉产木聚糖酶的应用特性研究. 饲料工业. 2002, 23(7): 38~40
- [21] 张红莲, 范云六. 木聚糖酶的分子生物学及其应用. 生物技术通报. 2002, 30(3): 23~26
- [22] 张建新, 李学梅, 姜丽娜等. 黑曲霉固态发酵木聚糖酶中试条件的研究. 微生物学杂志. 2003, 23(4): 20~22
- [23] 张年凤, 赵允麟. 黑曲霉产木聚糖酶的研究. 食品与发酵工业. 2003, 29(7): 28~31
- [24] 张树政. 酶制剂工业. 科学出版社. 1998, 595~625
- [25] 赵玉蓉, 金宏, 陈清华. 无机盐对饲料酶活性影响的研究. 中国饲料. 2005, 3: 31~32
- [26] 周德庆. 微生物学教程(第 2 版), 高等教育出版社. 北京: 2002, 82~87
- [27] 朱静等. 微生物产生的木聚糖酶的功能和应用. 生物工程学报. 1996, 12(4): 375~378
- [28] 邹永龙, 王国强. 木聚糖酶降解酶系统. 植物生物学通讯, 1999, 35(5): 404~410
- [29] Ball A S, McCarthy A J. Production and Purification of Xylanase from Actinomycetes[J]. J Appl Bacteriol, 1989, 66: 439~444.
- [30] Beg Q K, Bhushan B, Kapoor M, *et al.* Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces sp.* QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. Enzyme Microb Technol, 2000, 27: 459~466

- [31] Beily P. Biotechnological potential and production of xylanolytic system free of cellulase. ACS Symp Ser, 1991, 460: 408~416
- [32] Berenger j, Frixon C, Creuzet N, *et al.* Production, purification and properties of thermostable xylanase from *Clostridium stereorarium*. Can J Microbiol, 1985, 31: 635~643
- [33] Bernard henrissat A. Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem J, 1991, 280: 309~316
- [34] Biliadweis C G, Izydorczyk M S, Rattan O. Effect of arabinoxylans on bread-making quality of wheat flours. Food Chemistry, 1995, 53: 165~171
- [35] Blely P, Microbial xylanolytic systems, Trends in Biotechnology, 1985, 3(11): 286~290
- [36] Choct M, Huges R P, *et al.* Non-starch polysaccharide-degrading enzymes increase the performance for broiler chickens fed wheat and low apparent metabolizable energy. J Nutr, 1995, 25:485~492
- [37] Clark T A, Steward D, Bruce M E, *et al.* Improved bleachability of radiata pine kraft pulps following treatment with hemicellulolytic enzymes. Appita, 1991, 44(6): 389~404
- [38] Classen H L. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. Anim Feed Sci Technol, 1996, 62:21~27
- [39] Courtin C M, Gelders G G and Delcour J A. The use of two endoxylanases with different substrate selectivity provides insight into the functionality of arabinoxylans in wheat flour breadmaking. Cereal Chemistry, 2001, 78: 564~571
- [40] Courtin C M, Delcour J A. Arabinoxylans and endoxylanase, in wheat flour bread-making. Journal of Cereal Science, 2002, 35:225~243
- [41] Damaso M C, Andrade C M., Pereira Junior N. Use of corncob for endoxylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. Appl Biochem Biotechnol. 2000 Spring, 84-86: 821~34.
- [42] Daniela Farani de Souza, Cristina Giatti Marques de Souza, Rosane Marina Peralta. Effect of easily metabolizable sugars in the production of

- xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid-state fermentation, *Process Biochemistry*, 2001, 36: 835~838
- [43] Deshpande V, Lachke A, Mishra C, *et al.* Mode of action and properties of xylanase and β -xylosidase from *Neurospora crassa*. *Biotechnol Bioeng*, 1986, 26: 1832~1837
- [44] Dey D, Hinge J, Shendye A, *et al.* Purification and properties of extracellular endoxylanase from an alkalophilic thermophilic *Bacillus sp.* *Can J Microbiol*, 1992, 38: 436~442
- [45] Eda S, Ohnishi A and Kato K. Xylan isolated from the stalk of *Nicotiana tabacum*. *Agric Biol Chem*, 1976, 40: 359~364
- [46] Gessesse A, Mamo G. High-level xylanase production by an alkalophilic *Bacillus sp.* By using solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol*, 1999, 25: 68~72
- [47] Gil M J, Callejo M J, Rodríguez G, *et al.* Keeping qualities of white pan bread upon storage: effect of selected enzymes on bread firmness and elasticity. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung and Forschung*, 1999, 208: 394~399
- [48] Gil M J, Callejo M J, Rodríguez G, *et al.* Keeping qualities of white pan bread upon storage: effect of selected enzymes on bread firmness and elasticity. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung and Forschung*, 1999, 208: 394~399
- [49] Gilbert H J and Hazlewood G P. Bacterial cellulases and xylanases. *J Gen Microbiol*, 1993, 139: 187~194
- [50] Gilbert H J, Hazlewood G P. Bacteria Cellulase and Xylanase *J Gen Microbiol*, 1993, 139: 187~194.
- [51] Gomes J, Gomes I, Kreiner W, *et al.* Production of high level xylanase by a wild strain of *thermomyces lanuginosus* using beechwood xylan. *J Biotechnol*, 1993, 30: 283~297
- [52] Grajek W Production of D-xylanases by thermophilic fungi using different methods of culture. *Biotechnol Lett*, 1987, 9: 353~356

- [53] Grajek W. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, 26: 126~129
- [54] Gruppen H, Kormelink F J M and Voragen A G J. Enzymic degradation of water-unextractable cell wall material and arabinoxylans from wheat flour. *Jourl of Cereal Science*, 1993, 18: 129~143
- [55] Haapala R, Linko S, Parkkinen E, *et al.* Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam. *Biotechnol Tech*, 1994, 8: 401~406
- [56] Haltrich D, Preiss M and Steine W. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. *Enzyme Microb Technol*, 1993, 15(10): 854~860
- [57] Haltrich D, Prenner E, Prieb M, *et al.* Production of extremely high values of xylanase activity by *Schizophyllum commune*. In: Kuwahara M, Shimada M, eds. *Biotechnology in the pulp and paper industry*. Uni Tokyo: ptoc 5th Int Conf Biotechnol Pulp Paper Ind, 1992, 123~128
- [58] Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe K D, *et al.* Production of fungal xylanase. *Biores Technol*, 1996, 58: 137~161
- [59] Haros M, Rosell C M and Benedito C. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. *European Food Research and Technology*, 2002, 215: 425~430
- [60] Hop M M, Hempel C, Deckwer W D. Cellulase-free xylanase by *Thermomyces langinosus* RT 9: effect of agitation, aeration and medium components on production. *J Biotechnol*, 1994, 37: 49~58
- [61] Hrmova M, Biely P and Vrsanska M. Specificity of cellulase and Li-xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414. *Arch Microbiol*, 1986, 144: 307~311
- [62] Jeffries TW. Biodegradation of lignin and hemicellulose. In: Ratledge C, eds. *Biochemistry of Microbial Degradation*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994, 233~277

- [63] Jung HJG, Ralph J, Haffield RD: Degradability of phenolic acid hemicellulose esters: a model system. *J Sci Food Agric*, 1991, 56: 469~478
- [64] Kalogeris E, Christakopoulos P, Kekos D, *et al.* Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. *Journal of Biotechnology*, 1998, 60: 155~163
- [65] Kato K. *Encycl. Plant Physiol. New Ser.*, 1981, 13B: 29~46
- [66] Kluepfel D, Vets-Menta S, Aujmont F, *et al.* Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B). *Biochem J*, 1990, 267: 45~50
- [67] Krishnaray L and Hosoney R C. Enzymes increase loaf volume of bread supplemented with starch tailings and insoluble pentosans. *Jourl of Food Science*, 1994, 59: 1251~1254
- [68] Kulkarni N, Shendye A and Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanase. *FEMS Microb Rev*, 1999, 23: 411~456
- [69] Kulkarni N, Shendye A and Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanase. *FEMS Microb Rev*, 1999, 23: 411~456
- [70] Laurikainen T, Härkönen H, Autio K, *et al.* Effects of enzymes in fibre-enriched baking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 76: 239~249
- [71] Leathers TD, Detroy RW, Bothast RJ. Induction and glucose repression of xylanase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Lett*, 1986, 8: 867~872
- [72] Lee S F, Forsberg C W and Rattray J B. Purification and characterization of two endo-xylanases from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53: 644~650
- [73] Lischig T, Purkarthofer H and Steiner W. Thermostability of endo- β -xylanase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnol Lett*, 1993, 15: 411~414

- [74] Martínez-Anaya M A and Jiménez T. Functionality of enzymes that hydrolyse starch and non-starch polysachwride in the breadmaking. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung and Forschung*, 1997, 205:209~214
- [75] Maximo C, Ferriera M C, Duarte J. Some Properties of Eucalyptus Kraft Pulp Treated with Xylanase from *Aspergillus Niger* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 1998, 14: 365~367.
- [76] McCarthy A J, Peace E and Broda P. Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985, 21: 238~244
- [77] Morosoli k J, Bertrand J L, Mondou F, et al. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. *Biochem J*, 1986. 239: 587~592
- [78] Paul J and Varma A K. Influence of sugars on endoglucanase and β -xylanase activities of a *Bacillus* strain. *Biotechnol Lett*, 1990, 12: 61~64
- [79] Perez-Avalos O P, Teresa P, Ignacio M, et al, Induction of xylanase and Li-xylosidase in *Cellulomonas fravigena* growing on different carbon sources. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 46: 405~409
- [80] Prade, R. A. (1995) *Biotechnol. & Genet. Eng. Rev.* 13, 100~131
- [81] Purkarthofer H and Steiner W. Induction of endo- β -xylanase in the fungus *Thermomyces lanuginosus*, *Enzyme Microbiol Technol.* 1995. 17: 114~118
- [82] Raquel A, Carolina A, Emilia C, et al. Stability and chemical modification of xylanase from *Aspergillus sp.* *Biotechnol Appl Biochem*, 1997, 25:19~27
- [83] Roberts J C, McCarthy A J, Flynn N J, et al. Modification of paper properties by the pretreatment of pulp with *Saccharomonospora viridis* xylanase. *Enzyme Microb Technol*, 1990, 12: 210~213
- [84] Roche N, Desgragnes C, Durand A. Study on the solid-state production of a thermostable a-L-arabinofuranosidase of *Thermoascus aurantiacus* on sugar beet pulp. *J Biotechnol*, 1994, 38: 43~50

- [85] Rouau X, El-Hayek M-L and Moreau D. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flours on relation to changes on pentosan properties. *Journal of Cereal Science*, 1994, 19: 259~272
- [86] Rouau X. Investigations into the effects of an enzyme preparation for baking on wheat flour dough pentosans. *Journal of Cereal Science*, 1993, 18: 145~157
- [87] Roussos S, Raimbault M, Saucedo-Castaneda G, *et al.* Kinetics and ratios of carboxymethyl cellulase and filter paper activities of the cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum* on different substrates in solid state fermentation. *Microl Neotrop Appl*, 1991, 4: 19~40
- [88] Shei j C, Fratzke A R, Frederick J R, *et al.* Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. *Biotechnol Bioeng*, 1985, 27: 533~538
- [89] Singh S, Reddy P, Haarhoff J. Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase. *J Biotech*, 2000, 81: 119~128
- [90] Sprossler B G Xylanases in baking. In: Angelino SAGF *et al.*, eds. The first European symposium on enzymes and grain processing. The Netherlands: TNO Nutrition and Food Research Institute, 1997, 177~187
- [91] Srinivasan M C, Rele M V . Microbial xylanases for paper industry.
- [92] Steinfeldt S, Bach K E, Borsting C F, *etal.* 1995. The nutritive value of decorticated mill fractions of wheat. *J Anim Sci*, 54: 249~265
- [93] Steinfeldt S, Mullertz A, Jensen J F. 1998. Enzyme supplementation of wheat-based diet for broilers. *75: 27~64*
- [94] Stutzenberger F J and Bodime A B. Xylanase production by *Thermomonospora curvata*. *J Appl Bacteriol*, 1992, 72: 504~511
- [95] Sunna A, Antranikian G. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 1997, 17: 39~ 67.
- [96] Teleman A, Harjupaä V, Tenkanen M, *et al.* Characterisation of 4-deoxy- β -1-threo-hex-enopyranosyluronic acid attached to xylan in pine kraft

pulp and pulping liquor by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. Carbohydr Res, 1995, 272: 55~71

[97] Tuohy M G and Coughlan M P. Production of thermostable xylan degrading enzymes by *Talaromyces emersonii*. Biores Technol, 1992, 39: 131~137

[98] Viikari L, Ranua M, Kantelinen A, *et al.* Bleaching with enzymes. Proc. 3rd. Int. Conf. Biotechnol pulp Paper Ind. Stockholm, 1986, 67~69

[99] Weiland P. Principle of solid state fermentation. In: Zadrazil F, Reiniger P, Eds. Treatment of Lignocelluloses with White Rot Fungi. London: Elsevier, 1988, 64~76

[100] Wong K K Y, Saddler J N. *Trichoderma* xylanases, their properties, their properties and application. Crit Rev Biotechnol, 1992, 12(5/6): 413~435

[101] Wong K K Y, Tan L U L and Saddler J N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in Microorganism: Functions and Application. Microbiol review, 1998, 52: 305~317

[102] Wong. K. K. Y Tan. L. U. L, Saddler. J. N, Multiplicity of β -1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications, Microbiology Review, 1988, 52: 305~312

[103] Yoshioka H, Nagato N, Chavanich S, *et al.* Purification and properties of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. Agric Biol Chem, 1981, 45: 2425~2432

[104] Yu E K C, Tan L U L, Chan M H K, *et al.* *Thermoascus aurantiacus*. Enzyme Microbiol Technol, of thermostable xylanase by a thermophilic fungus, 1987, 9: 16~25

致 谢

光阴荏苒，岁月如歌，经历过痛苦和曲折，但信念执著。在本文完成之际，谨向山东农业大学食品科学与工程学院，向几年来栽培我的导师杜金华教授致以最崇高的敬意和诚挚的感谢。

恩师诚信处世的高尚的人格，严谨治学的科研态度，虚怀若谷的宽广胸怀，以及敬业尽职的务实作风深深影响着我，使我每遇失意和挫折时不气馁，及时调整状态，振奋精神，去争取成功。杜老师对学科前沿和研究方向的敏锐与正确把握，使我在科研道路上受益匪浅。在学业即将完成之际，再次向她表示深深的谢意！

衷心感谢宝来利来公司的各位领导，为我的论文的顺利完成给予的便利条件，以及公司研究院的徐海燕、张志焱、谷巍、刘红等在实验材料的准备和实验样品的分析方面的热心帮助，他们丰富的实践经验将使我今后工作中取之不尽的源泉。

· 特别感谢实验室的师兄弟姐妹徐希柱、付聿成、刘兆玺、马明、王妮娅、李兰晓、于玲、孙振涛、刘成、高卫卫、商曰玲等同学在生活 and 实验中给予的关心和帮助。

感谢家人和亲友的理解与支持，是他们在身后默默无私的帮助，使我能够全身心地投入到学业中来，特别是我的丈夫李军训对我一如既往的勉励和照顾。

高 洁

2007. 5. 26

攻读学位期间发表论文情况

- [1] 高洁,李军训,杜金华,肖军. 黑曲霉 ASP-12 固态发酵木聚糖酶培养条件研究. 饲料工业, 2006, 27(6): 16~18 (第一作者)
- [2] 徐希柱,杜金华,高洁,武建堂. 碱-酶法提取啤酒酵母粉中 β -(1, 3)-D-葡聚糖. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 145~149
- [3] 马明,杜金华,王囡,高洁,商曰玲. 一株产纳豆激酶菌株的分离筛选及鉴定. 食品与发酵工业, 2007, 33(5):17~21
- [4] 李军训,高洁,王建华,杜金华. 青贮乳酸菌的发酵生物量研究. 饲料工业. 2004, 25(7): 48~51